

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

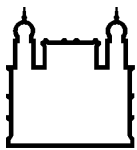
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

A AUTOFAGIA DO HOSPEDEIRO NA INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*:  
POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS E RESPOSTA IMUNE

THABATA LOPES ALBERTO DUQUE

Rio de Janeiro

Setembro 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOFAGIA DO HOSPEDEIRO NA INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*:  
POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS E RESPOSTA IMUNE**

**THABATA LOPES ALBERTO DUQUE**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências na área de Biologia Celular e Molecular.

**Orientadores:** Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto

Dra. Andrea Henriques-Pons

Rio de Janeiro

Setembro 2017

Duque, Thabata Lopes Alberto.

A autofagia do hospedeiro na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: possíveis mecanismos envolvidos e resposta imune / Thabata Lopes Alberto Duque. - Rio de Janeiro, 2017.

158 f.

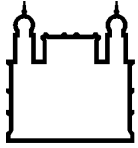
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto.

Co-orientadora: Andrea Henriques Pons.

Bibliografia: f. 129-158

1. autofagia. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. doença de Chagas. 4. cardiopatia. 5. resposta imune. I. Título.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

A autofagia do hospedeiro na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: possíveis mecanismos envolvidos e resposta imune

THABATA LOPES ALBERTO DUQUE

**Orientadores:** Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto

Dra. Andrea Henriques-Pons

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### **EXAMINADORES:**

Dra. Luciana Lopes de Almeida Ribeiro Garzoni (IOC/ Presidente)

Dr. Emiliano Horacio Medei (UFRJ)

Dra. Landi Veivi Guillermo Costilla (Unirio)

Dra. Mariana Caldas Waghbi (IOC/suplente)

Dra. Juliana de Meis (IOC/suplente e revisora)

Rio de Janeiro, 26 de setembro de 2017.

Esta tese foi desenvolvida sob orientação dos Drs. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto e Andrea Henriques-Pons nos Laboratórios de Biologia Celular e Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

*"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."*

*Cora Coralina*

## Agradecimentos

O que eu aprendi com a tese de doutorado? Sim, um começo filosófico... Ninguém vive sozinho, a gente não consegue nada só. O título de doutor(a) é de uma pessoa, mas a luta, a angústia, a alegria não... E eu tenho muito a agradecer...

Não posso começar essa etapa sem agradecer a quem sempre deu suporte a todas as minhas vontades... Minha família! Longe, muito longe ou perto, vocês são sempre meu porto! Obrigada mãe, pai, Thais, minhas tias e tios, minhas avós e demais agregados... Foram muitos dias longe, mas sempre contando com o apoio de vocês!

Ao meu chefinho Rubem! Obrigada pela CHANCE, CONFIANÇA sempre! Obrigada por esse projeto, deixar que eu crescesse, que eu pensasse. Foi um grande desafio para ambos. Obrigada por me mostrar seu FASCÍNIO com os parasitos, a microscopia, a mitocôndria, a bioquímica, a autofagia e as outras mortes. Sim, eu aprendi a amar esse mundo também. Essa foi uma tese pensada há 7 anos, e desde então tive o seu apoio, mesmo quando até dava errado. Grata por ser a Thabs, a sua aluna fora da sua área de conforto!

A minha orientadora Andrea. Obrigada pela PRESENÇA. Por entrar nesse projeto de corpo, alma e muitas ideias. Foi uma carga nova, uma LUZ no doutorado, um novo olhar que ajudou muito! O seu prazer em ensinar ou aprender empolga, contagia, ENCANTA! Muito obrigada por me fazer entender a imunologia, apaixonar-me por citometria, amar a interação com o hospedeiro. Agradeço imensamente, por tudo!

Um imenso agradecimento à Dra. Solange Lisboa de Castro, mas que para mim será sempre SOL - porque te representa, porque foi muito isso quando precisei, ainda mais nos últimos tempos... Poder conviver contigo é aprendizado, é conforto,

é esperança, é INCENTIVO, é um PRAZER.... E sim, esse OBRIGADA causará ciúmes...

A banca avaliadora, por ter aceitado prontamente essa tese, agradecida pelas colaborações, sugestões e toda a opinião.

Muito obrigada SALA 70! Aos meus alunos (e ex) de IC - Felipe, Camila, Thamires - minha pupila ciumentinha... Obrigada por me ensinarem muito também!!!! A querida Keyla, que dividiu o carma do doutorado comigo, Renatinha, Carlos (vamos vencer!!!!), Jujuzinha, Yasmin, Ana, Luiza (mal chegou e considero pacas)...

Aos demais membros do LBC, Dra. Kelly Salomão, Dr. Gabriel Oliveira (não seria nada senão fosse todo o seu suporte nos experimentos *in vivo!*), Marcos Meuser, Patrícia Bernardino, Raíza Brandão, a toda a equipe da Dra. Nazaré Soeiro, chefe do Laboratório de Biologia Celular, minha "segunda casa". Muito grata pela acolhida desde o início. Vocês colaboraram e muito com todo o desenvolvimento desse trabalho. Muitíssimo grata.

E o que seria de mim sem os anjos da Andrea? Cynthia e Dani, vocês foram meus anjos da guarda, maravilhosas conselheiras... Quantas vezes eu perturbei e vocês prontamente me auxiliaram... Um enorme OBRIGADA! Só vocês me entenderem em muitos momentos tensos. Eu quero levá-las comigo para todos os lugares pois formam uma equipe linda, participativa, auxiliadora e AMIGONA! Ao querido "grupo Luz" - Marcelo, Natália, Fernando, Juliana, Samuel... Vocês são maravilhosos! Sem palavras para a ajuda e apoio de vocês. Até poderia passar mais tempo no LBC, mas correr para vocês era sempre ótimo! Contem comigo sempre que precisar! Muito obrigada LITEB, chefiado pela Dra Tânia Araújo-Jorge, que também foi a extensão do meu lar...

Aos colaboradores deste projeto... Dr Leonardo Travassos e Mariana Siqueira (meu braço direito no UFRJ!) Muito obrigada pelos ensinamentos com transfecção, RNAi, GFP... A autofagia agradece!

À Dra Luiza Pereira, que trouxe as *Leishmanias* para a minha vida e me ensinou muito sobre a vida de PCR. Você é um ser maravilhoso, é um prazer tê-la no meu círculo!



Às plataformas de Citometria de Fluxo (IOC e PDTIS/Fiocruz) e Microscopia Confocal (Pedro Paulo, tu foste um anjo também!!!) por todo o suporte nesse trabalho.

Aos amigos de sempre... Minha *roomie* e eterna irmã científica Natalinha, minhas flores desde JF Grazi, Laurinha (distância nunca foi problema para manter amizade), meus amigos de infância Pedrinho e Clara, meus amigos de RJ ou qualquer lugar (dentro ou fora desse mundo científico) Michele, Paula, Nat(h)s, “pretty” lindas do meu coração...

À grande amiga Mariana Gandini, que também foi minha citometrista de plantão, dando muita ajuda científica (ou não: para ajudar no projeto doutora sarada, para contribuir nos comes e bebes sempre, para falar e falar...) nessa tese...

À Pós-Graduação de Biologia Celular e Molecular, por todo o suporte. Aprendi muito com vocês (E que aprendizado de representante discente, de participação em CPG... E que disponibilidade que sempre mostraram!)

Às agências financiadoras deste projeto.

Conheci tanta gente legal nessa Fiocruz que prefiro não mencionar nomes para não esquecer de ninguém... Eu pentelhei vários laboratórios, seja para um reagente ou para usar um equipamento e isso só foi possível porque encontrei pessoas boas aqui... Sim... Vocês também me ajudaram e muito!!!!

# Resumo

## Tese de doutorado

A doença de Chagas é provocada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e dentre suas manifestações clínicas, destaca-se a inflamação cardíaca. Diversas vias da célula hospedeira estão relacionadas ao ciclo do parasito, incluindo a fagocitose e autofagia. Além disso, o desenvolvimento da patogênese depende da resposta imune do hospedeiro. A autofagia é um processo de degradação de componentes citoplasmáticos presente em células eucarióticas associado a sinalização celular, cuja regulação pode afetar processos celulares, incluindo as infecções intracelulares, possibilitando o desenvolvimento da doença. No presente estudo, avaliou-se a participação da autofagia durante a infecção por *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*, analisando: (1) a contribuição desta via durante a infecção em células fagocíticas e não-fagocíticas profissionais; (2) o papel potencial da autofagia na miocardite chagásica aguda, utilizando sua modulação farmacológica pela rapamicina. Primeiro, a análise de autofagia através da avaliação da expressão de LC3 em células cardíacas e macrófagos submetidos à indução por rapamicina ou meio de estresse nutricional aumentou o número de autofagossomos sem a perda de viabilidade. Em culturas infectadas, ambas as células mostraram maior expressão de LC3, principalmente aquelas nas quais o parasito foi internalizado. O tratamento com rapamicina compromete a viabilidade do parasito, contudo o estresse nutricional não o afeta, inclusive na infectividade. Assim, as células sob estresse nutricional diminuem a infecção nas duas células hospedeiras, em diferentes momentos do ciclo do parasito. Enquanto macrófagos reduzem a internalização, confirmada pela menor fagocitose de partículas inertes e parasitos mortos, em células não-fagocíticas, a diminuição ocorre pelo bloqueio da proliferação ou impedimento da diferenciação, eliminando o parasito, também corroborado pelas células ATG5<sup>-/-</sup> submetidas à infecção. *In vivo*, diferentes cargas parasitárias induziram autofagia, principalmente em células endoteliais e cardiomiócitos, sem associação ao número de parasitos inoculados. O tratamento por 10 dias com rapamicina levou a alterações elétricas, sem induzir danos bioquímicos renais, cardíacos ou hepáticos. Em animais infectados, a rapamicina não afetou a carga parasitária, como previamente observado *in vitro*. Apesar disso, o fármaco induziu um aumento do número de células T de memória no baço e redução do peso do órgão. Rapamicina ainda apresentou papel protetor no coração dos animais infectados diminuindo o intervalo PR, dano cardíaco por CK-MB e infiltrados inflamatórios, reforçando a via autofágica como benéfica ao hospedeiro durante a infecção pelo *T. cruzi*, reforçando a possibilidade de intervenções terapêuticas nesta via na modulação da resposta imune.

## Abstract

### Phd Thesis

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and among the clinical manifestations cardiac inflammation poses a crucial role. Many host pathways are related to parasite intracellular cycle, including phagocytosis and autophagy. In addition, development of this disease depends on the host immune response. Autophagy is a eukaryotic mechanism that leads to degradation of cytoplasmic components and cell signaling, and its modulation disturb cell functions under stress, including in case of intracellular infections, potentially affecting the outcome of the pathology. In the present study, we evaluated the role of autophagy during *T. cruzi* infection *in vitro* and *in vivo*, analyzing: (1) the contribution of this process in the infection of professional and non-professional phagocytic cells; (2) potential role of autophagy in chagasic acute myocarditis, using pharmacological modulation by rapamycin. Firstly, we evaluated autophagy by LC3 expression in starved or rapamycin-treated cells and observed that cardiac cells and macrophages are inducible without cell loss. Then, these cells showed an upregulation of LC3 after *T. cruzi* infection, especially when the parasite were within host cell. Rapamycin affects parasite viability but starved trypomastigotes were not modulate in infection. Starvation process decreased infection in both host cells in different periods of parasite cycle: while in macrophages reduces internalization, confirmed by reducing phagocytosis from inert particles and dead parasites, in non-phagocytic cells decreased infection is associated by hampering parasite proliferation and/or differentiation, confirmed by ATG5<sup>-/-</sup> cells submitted to the infection. *In vivo*, autophagy is upregulated in cardiac tissue, mainly in endothelial and cardiac cells, and its induction is not associated with parasite inocula. We treated mice with rapamycin for 10 days and observed that this drug affects ECG profile, but do not alter cardiac, renal or hepatic biochemical parameters. After the treatment with parasite cytotoxicity was not observed as in *in vitro* assays. Nevertheless, rapamycin also induced upregulation of memory T cells in infected spleen associated with reduced tissue/ animal weight ratio, also conferring a cardiac protection by reducing PR interval, decreased CK-MB values and inflammatory foci. Our data reinforce autophagy as beneficial to host during the infection and its possibility as therapeutic intervention in this pathway by its modulation in immune response.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 3-MA: 3-metiladenina
- 7AAD: 7 aminoactinomicina D
- ALFY: proteína autofágica ligada a FYVE
- ALT: alanino aminotransferase
- AMC: autofagia mediada por chaperona
- AMP: 5' adenosina monofosfato
- AMPC: adenosina monofosfato cíclico
- AMPK: quinase ativada por AMP
- ANOVA: análise de variância
- ANP: peptídeo natriurético atrial
- ASP-2: proteína de superfície de amastigota 2, do inglês "Amastigote Surface Protein – 2"
- AST: aspartato aminotransferase
- ATCC: Coleção americana de tipos de cultura, do inglês "American Type Culture Collection"
- ATG: genes relacionados a autofagia
- ATP: adenosina trifosfato
- AV: átrio-ventricular
- Bag-1: proteína atanogena associada a Bcl-2
- BAG3 – proteína antanogênica associada a Bcl2, do inglês "BCL2 associated athanogene 3"
- BAV: bloqueio átrio-ventricular
- BBA: beta-bloqueadores adrenérgicos
- BCG: Bacilo Calmette-Guérin
- Bcl-2: linfoma 2 de célula B
- Bcl-xL: Linfoma de células B extra grande
- BENEFIT – programa para avaliação da Avaliação do Benznidazol na Interrupção da Tripanosomíase, do inglês "Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis"
- BPM: batimentos por minuto
- BNP: peptídeo natriurético cerebral

BSA: albumina sérica bovina  
BT: tripomastigota sanguíneo, do inglês “bloodstream trypomastigote”  
Bz: Benznidazol  
CC: célula cardíaca  
CCL2: motivo ligante de quimiocina 2  
CCL-81: linhagem de epitélio renal de macaco verde africano  
CD: grupamento de diferenciação, do inglês “cluster of differentiation”  
CDC 37: cell division cycle 37  
CHO: ovário de hamster chinês  
CK-MB: creatina quinase isoenzima MB  
DABCO: octano do diazabicyclo 1.4 [2.2.2]  
DAG: diacilglicerol  
DAPI : 4,6 diamidino-2-fenilindol  
DMEM: meio Eagle modificado por Dulbecco  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucléico  
DNDi: Iniciativa de drogas para doenças negligenciadas, do inglês “Drugs for Neglected Diseases initiative”  
dpi: dia pós infecção  
ECG: eletrocardiograma  
EEA1: antígeno de endossomo inicial 1  
ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”  
ESCRT: proteínas do complexo endossomal de direcionamento de transporte  
FAS: receptor de morte de superfície celular  
FC: frequência cardíaca  
FCCP: carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona  
FIP200 - Proteína de interação com ULK  
FKBP12: proteína ligante de FK506 1A ou tacrolimus  
FSC: dispersão frontal de luz, do inglês “Forward Scatter”  
FYVE: dedos de zinco com domínios ricos em cisteína  
GABARAP: proteína associada ao receptor gama-aminobutírico  
GFP: proteína verde fluorescente, do inglês “green fluorescent protein”  
GM-CSF: fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos

gp: glicoproteína  
GTP: guanosina trifosfato  
HDAC: histonas deacetilases  
HE: hematoxilina – eosina  
HeLa: célula epitelial humana  
HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfônico  
HIV: vírus da imunodeficiência humana  
Hip: proteína de interação a hsc70  
Hop: proteína de organização de hsc70-hsc90  
HR: batimento cardíaco  
Hsc: cognato de choque térmico, do inglês “Heat Shock Cognate”  
Hsp: proteína de choque térmico, do inglês “heat shock protein”  
IECA: inibidores da enzima de conversão da angiotensina  
IFN- $\gamma$  : interferon-gamma  
Ig: imunoglobulina  
IL: interleucina  
IP<sub>3</sub>: inositol-3-fosfato  
kDNA: DNA do cinetoplasto  
KFERQ: lisina, fenilalanina, ácido glutâmico, arginina e glutamina  
L929: fibroblasto humano  
LAFB: hemibloqueio anterior esquerdo  
Lamp-2A: proteína de associação à membrana lisossomal 2A  
LAP: fagocitose associada a LC3, do inglês “LC3-associated phagocytosis”  
LC3: proteína de cadeia leve 3  
LPS: lipolissacarídeo  
MARCO: receptor de macrófago com estrutura de colágeno  
MASP: Proteínas de superfície associadas à mucina, do inglês “mucin-associated surface protein”  
Mcl-1: regulador de apoptose Bcl-2  
MCP-1: proteína quimiotática de monócito 1  
MEF: fibroblasto embrionário murino  
MFI: mediana da fluorescência  
MHC: complexo de histocompatibilidade principal  
mLST8: proteína associada a mTOR

MOI: razão da infecção, do inglês “mode of infection”

MSF: Médicos Sem Fronteiras

mSIN1: quinase associada a ativação por mitógeno 1

MSR1: receptor “scavenger” de macrófago 1

mTOR: proteína mecanística alvo da rapamicina

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

MΦ : macrófago peritoneal

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Nif: Nifurtimox

NK: células matadoras naturais, do inglês “Natural killer”

NO: óxido nítrico

NOX2: NADPH oxidase 2

OCT: temperatura ótima para corte, do inglês “optimum cutting temperature “

OD: densidade óptica

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde

PBS: tampão fosfato salino

PCR: reação de cadeia polimerase

PE: fosfatidiletanolamina

PFA: paraformaldeído

PI3K: fosfatidilinositol-4,5 bifosfato-3 quinase

PI3P: fosfatidilinositol-3-fosfato

PLC: fosfolipase C

PMN: microautofagia do núcleo, do inglês “Piecemeal Microautophagy of Nucleus”

POP: proliloligopeptidase

PPR: receptores de padrões de patógenos

PRR5: proteína prolina rica 5

Rabs: família de pequenas GTPases Ras-like

RBBB: bloqueio do ramo direito

RICTOR: proteína insensível a rapamicina ligada a mTOR, do inglês “Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin”

ROS: espécies reativas de oxigênio, do inglês “Reactive Oxygen Species”

RPMI: meio do Instituto Memorial Roswell Park, do inglês “Roswell Park Memorial Institute medium”

RUBICON: proteína de interação com beclina-1, do inglês: “RUN and cysteine rich domain containing beclin 1 interacting protein”

SAP: proteína rica em serina, alanina e prolina, do inglês “serine-, alanine-, and proline-rich protein”

SFB: soro fetal bovino

SQSTM1: sequestrossomo 1

SSC: dispersão lateral da luz do feixe, do inglês “Side Scatter”

Tc: proteína liberada por *Trypanosoma cruzi*

TCR: receptor de células T, do inglês “T-cell receptor”

TCT: tripomastigota obtido de cultura, do inglês “tissue-cultured trypomastigote”

TcVPS: proteínas de endereçamento vacuolar

TGF-  $\beta$  : fator de transformação do crescimento beta

Th: célula T “helper” (auxiliadora)

TLR: receptores do tipo “toll”

TMRE: etil ester perclorato de tetrametilrodamina

TNF- $\alpha$  : fator de necrose tumoral alfa

Treg: célula T regulatória

TS: transialidases

TSA-1: transialidase de superfície 1

ULK 1: quinase Unc-símile, do inglês “Unc-like kinase”

UVRAG: proteína associada a resistência da radiação ultravioleta

Vac: proteína de ancoragem presente nos vacúolos

VP: vacúolo parasitóforo

Vps34: proteína de endereçamento vacuolar, “*Vacuolar protein sorting*” 34

WIPI: domínio de repetição WD

zFYVE1: proteína com dedos de zinco com domínios ricos em cisteína 1



## ÍNDICE

Resumo	x
Abstract	xi
I. INTRODUÇÃO	1
1. A doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.1. Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	3
1.2. Transmissão e epidemiologia	5
1.3. Diagnóstico e tratamento	8
1.4. Fases da doença de Chagas	11
1.4.1. Cardiomiopatia chagásica	13
1.5. A infecção pelo <i>T. cruzi</i> – interação com a célula hospedeira	17
2. Autofagia	21
2.1. Tipos de autofagia	22
2.1.1. Autofagia mediada por chaperona	23
2.1.2. Microautofagia	25
2.1.3. Macroautofagia	25
2.1.3.1. mTORC1 e a rapamicina	31
2.2. Autofagia em cardiopatias	32
2.3. Autofagia no sistema imune	34
2.3.1. Autofagia e fagocitose	36
2.3.2. Autofagia nas infecções	38
2.3.2.1. Xenofagia	38
2.3.2.2. Autofagia nas infecções por protozoários	39
3. Justificativa	42
II. OBJETIVOS	44
1. Objetivo geral	44
2. Objetivos específicos	44
III. Material e métodos	45

1.Ensaio <i>in vitro</i>	45
1.1.Cultura de células	45
1.1.1.Células primárias	45
1.1.2. Células de linhagem	46
1.2. Parasitos	46
1.3. Indução de autofagia	47
1.3.1. Citotoxicidade	47
1.3.2. Citometria de fluxo	47
1.4. Interação patógeno-célula hospedeira	48
1.4.1. Avaliação da autofagia na infecção por <i>T. cruzi</i>	48
1.4.2. Avaliação da autofagia na fagocitose	51
1.5. Imunofluorescência	52
2. Ensaio <i>in vivo</i>	53
2.1. Modelo murino e infecção	53
2.2. Tratamento com rapamicina	54
2.3. Parasitemia e mortalidade	54
2.4. Dosagem bioquímica	55
2.5. Eletrocardiograma	56
2.6. Análises histopatológicas	56
2.7.Coleta de células e imunofenotipagem por citometria de fluxo	57
2.8. Ensaio de bloqueio de autofagia <i>ex vivo</i>	59
2.9. Imunofluorescência	60
3.Análise estatística	60
4. Aspectos éticos	61
IV. RESULTADOS	62

1. <i>In vitro</i>	62
1.1. Efeito direto da indução autofágica na viabilidade das células hospedeiras e do <i>T. cruzi</i>	62
1.2. Avaliação da autofagia durante a infecção por <i>T. cruzi</i>	67
1.3. A influência da indução autofágica na infecção por <i>T. cruzi</i>	69
1.4. Avaliação da capacidade fagocítica sob indução de estresse nutricional	74
1.5. Avaliação da inibição da autofagia por silenciamento de genes da via autofágica	76
2. <i>In vivo</i>	80
2.1. Análise autofagia na infecção aguda no modelo murino	81
2.2. Padronização da indução autofágica em camundongos	85
2.3. Avaliação da indução autofágica em camundongos infectados	88
V. DISCUSSÃO	112
VI. CONCLUSÕES	128
VII. REFERÊNCIAS	129

## I. INTRODUÇÃO

### 1. A doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

Em 1907, o diretor do Instituto de Manguinhos, no Rio de Janeiro, Dr. Oswaldo Cruz incumbiu o pesquisador Carlos Chagas de executar uma campanha anti-paludismo no norte do estado de Minas Gerais por conta da construção de uma estrada de ferro. Chagas verificou a presença de um inseto hematófago, popularmente conhecido como barbeiro, que vivia nas frestas das casas de pau a pique e realizava o repasto sanguíneo, principalmente à noite. Ao levar tais insetos, assim como amostras de sangue para o laboratório, este pesquisador descreveu o *Trypanosoma cruzi*, e também o ciclo da doença, correlacionando a sintomatologia do paciente (Chagas, 1909). Desta forma, a nova tripanossomíase foi nomeada posteriormente como doença de Chagas ou tripanossomíase americana, em homenagem ao médico que descreveu a enfermidade (Coura, 2015).

Descoberta há 117 anos, essa infecção já foi relatada em populações que viveram na América há mais de 10.000 anos. Atualmente, a infecção afeta em torno de 6 milhões de pessoas em todo mundo segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), principalmente na América Latina. A doença de Chagas é endêmica em 21 países, sendo reportadas 7.000 mortes por ano, apresentando um imenso impacto econômico nos países afetados, principalmente na América Latina (Figura 1.1) (OMS, 2016; DNDi, 2017).



**Figura 1.1. Distribuição da doença de Chagas no mundo.** O número estimado de casos oficiais no mundo (círculos azuis) e a presença da transmissão vetorial, vetorial acidental e não-vetorial. No mapa apresenta-se os países endêmicos e também países da Europa, Ásia, Oceania no qual foram encontrados pacientes (Adaptado de OMS, 2010).

O protozoário *Trypanosoma cruzi* pertence à Classe Kinetoplastida, Ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, sendo um parasito obrigatório de mamíferos (formas tripomastigota e amastigota) e de insetos hematófagos da família Reduviidae (formas epimastigota e tripomastigota). As três formas presentes no ciclo evolutivo apresentam diferenças morfológicas, bioquímicas e na expressão gênica, contribuindo para adaptações ao hospedeiro e seu sucesso (Hoare & Wallace, 1966).

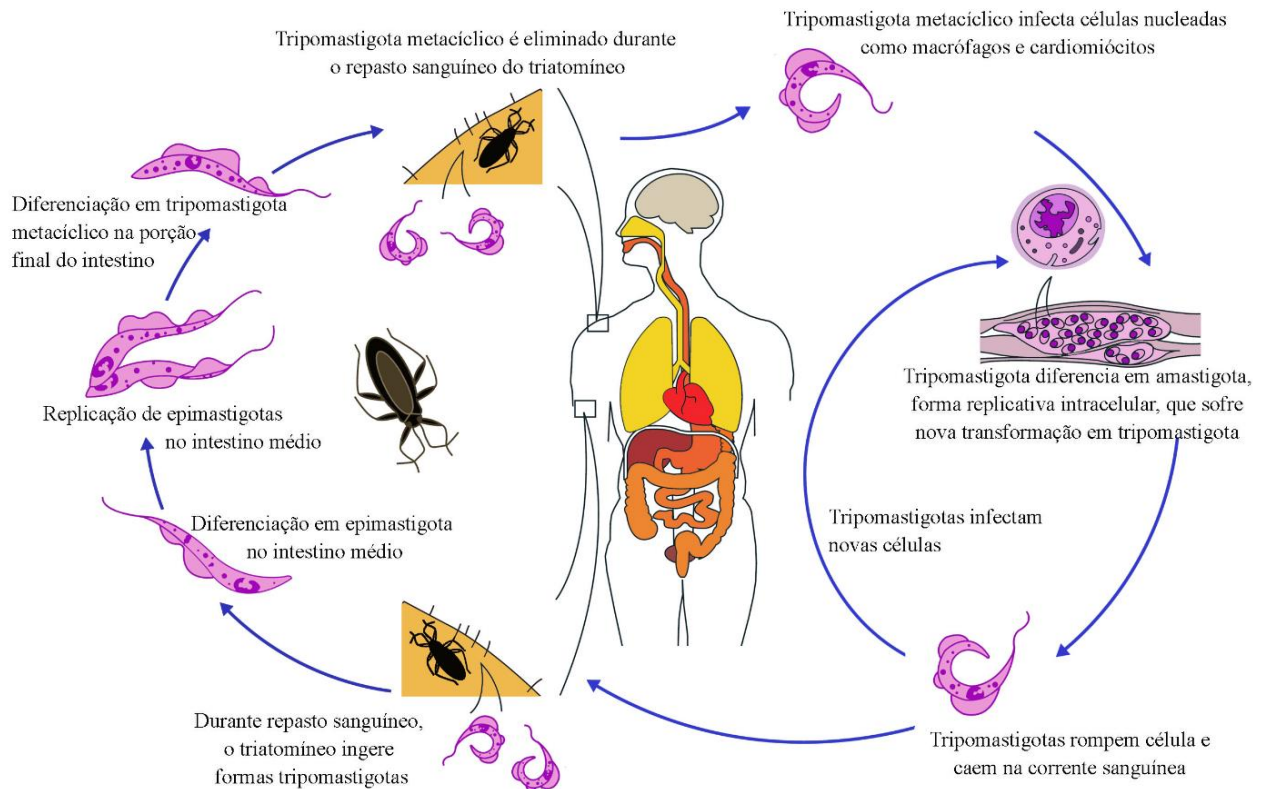
Com aproximadamente 12000 genes, codificando 22570 proteínas preditas, o genoma do *T. cruzi* apresenta diferenças entre demais eucariotos no reparo do DNA e na iniciação de replicação, refletindo em um DNA mitocondrial não-usual (El Sayed

et al., 2005). O parasito apresenta mitocôndria única e ramificada, com DNA concentrado em mini e maxicírculos interconectados (kDNA) que formam o cinetoplasto, representando 30% do genoma deste protozoário. A posição do cinetoplasto é uma característica morfológica importante para auxiliar na diferenciação das formas do parasito: em epimastigotas e amastigotas, a estrutura encontra-se em forma de barra, enquanto em tripomastigotas, apresenta uma forma arredondada. Além do cinetoplasto, as formas também são diferenciadas morfológicamente pela inserção e tamanho do flagelo, que se encontra interiorizado nas amastigotas, emerge da região posterior em tripomastigotas ou da antero-lateral no caso de epimastigotas (revisto em De Souza et al., 2009). Outras organelas não usuais são encontradas no *T. cruzi*, como acidocalcissomos, organelas de reserva energética secundária com acúmulo de fosfatos e íons de magnésio, zinco, cálcio e sódio, atuante também na manutenção do pH e osmolaridade, e os glicossomos, que são semelhantes à peroxissomos, e apresentam no seu interior enzimas da via glicolítica, beta-oxidação de ácidos graxos, pentoses (Michels et al., 2006; Docampo et al., 2010). Em epimastigotas, há ainda os reservossomos, que são considerados organelas pré-lisossomais (revisto em Soares, 1999).

### **1.1. Ciclo evolutivo do *T. cruzi***

*T. cruzi* apresenta dois hospedeiros, um mamífero e um inseto triatomíneo. Formas tripomastigotas são ingeridas pelo inseto durante a hematofagia, migram para a região do intestino médio do triatomíneo e se diferenciam na forma replicativa

epimastigota, começando no estômago. Na porção final do intestino ocorre nova diferenciação em tripomastigota metacíclico (metaciclogênese). Estas formas são eliminadas nas fezes e urina do inseto durante novo repasto sanguíneo e alcançam a corrente sanguínea do mamífero pela mucosa ou o dano provocado pela picada do triatomíneo. No local de inoculação, estas formas tripomastigotas infectam células nucleadas como macrófagos e células epiteliais. No interior da célula do mamífero, ocorre a diferenciação em amastigota, a forma intracelular proliferativa. Após sucessivos ciclos de replicação, uma nova transformação em formas tripomastigotas ocorre, rompendo a célula hospedeira. Novamente na corrente sanguínea, os parasitos são capazes de infectar novas células e tecidos, completando o ciclo quando ocorre um novo repasto sanguíneo pelo triatomíneo (Figura 1.2) (revisto em De Souza, 2009).



**Figura 1.2. Ciclo de vida do *T. cruzi*.** A forma tripomastigota metacíclica é liberada nas fezes e urina durante o repasto sanguíneo do triatomíneo e o parasito penetra no hospedeiro mamífero por mucosas ou feridas. O protozoário pode infectar quaisquer células nucleadas, dentre elas miócitos e macrófagos. No interior da célula hospedeira ocorre a diferenciação na forma replicativa amastigota, seguida de nova diferenciação em tripomastigota, forma que rompe a célula para infectar novas células e ser ingerida pelo triatomíneo durante o repasto sanguíneo. No interior do inseto, há diferenciação em epimastigota, a outra forma replicativa para posterior diferenciação em tripomastigota (Adaptado de Blum et al., 2008).

## 1.2. Transmissão e epidemiologia

A transmissão da doença de Chagas para humanos ocorre principalmente, no Brasil, através da via oral, por vetores triatomíneos (via clássica vetorial), transfusão de sangue e congênita; menos frequentemente por transplante de órgãos e acidentes de laboratório (Steindel et al., 2008; Altclas et al., 2008; revisto em Dias et al., 2011). O desenvolvimento de programas na América Latina focados na eliminação de vetores



domésticos e na triagem de doadores de sangue e com apoio da OMS e da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) como as Iniciativas do Cone Sul, dos Países Andinos e México, e de Países Amazônicos, levou a uma acentuada queda na prevalência da doença de Chagas de 16-18 milhões de pessoas em 1990 para 5-7 milhões em 2010 (revisto em Schofield et al., 2006; Guhl, 2007; Dias, 2009; Moncayo & Silveira, 2009). O primeiro programa (Iniciativa do Cone Sul), iniciado em 1991, levou ao controle do *T. infestans* no Uruguai, Chile, Brasil, Paraguai, e em algumas províncias na Argentina (revisto em Moncayo & Ortiz-Yanine, 2006; Coura, 2009). No Brasil, existem focos residuais nos estados do Rio Grande do Sul e Bahia e este triatomíneo continua a transmitir o parasito nos vales andinos da Bolívia, Argentina e no México (revisto em Coura & Viñas, 2010; Coura, 2015), justificando a necessidade de um monitoramento contínuo e do desenvolvimento de novas estratégias de controle (Gürtler, 2009).

Desde 1988, a triagem de sangue e seus produtos se tornou compulsória em muitos países da América Latina e atualmente 19 destes 21 países atingiram 100% de controle do sangue para doação (Schmunis, 1999; OMS, 2015; revisto em Castro, 2009; Moncayo & Silveira, 2009; Albajar-Viñas & Jannin, 2011). O monitoramento de bancos de sangue e transplante de órgãos – através de exames sorológicos ou até mesmo com o tratamento com violeta genciana (cristal violeta), são práticas necessárias, assim como tratamento de transmissão congênita e oral (OMS, 2010; Hashimoto & Schofield, 2012; Sarquis et al., 2012).

Na Argentina, com o sucesso dos programas de controle vetorial e da qualidade do sangue transfundido, a transmissão da doença de Chagas pela via

congenita se tornou uma fonte importante de novos casos da doença, com uma estimativa de 8.668 casos/ano (Gebrekristos & Buekens, 2014; OMS, 2015; revisto em Carlier et al., 2015). A taxa de transmissão vertical da doença de Chagas em áreas endêmicas é de 2-5% e o tratamento etiológico do recém-nato alcança 100% de cura parasitológica e baixo risco de efeitos adversos (revisto em Howard et al., 2014).

No Brasil, a transmissão por via oral, o mecanismo mais frequente entre vetores e mamíferos silvestres, adquiriu importância devido a mudanças ambientais provocadas (Abad-Franch & Monteiro, 2007; Coura & Junqueira, 2015). Entre 2000 e 2010, mais de 1000 casos de doença de Chagas aguda foram diagnosticados, sendo 71% destes devidos à ingestão de comida contaminada com triatomíneos infectados ou seus dejetos, carne de animais silvestres, vegetais e sucos e polpas de frutas (revisto em Ianni & Mady, 2005; Pereira et al., 2009; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Coura, 2015). A maioria destes casos de transmissão por via oral ocorreu na Amazônia brasileira (Valente et al., 2009; revisto em Coura et al., 1994; Coura & Junqueira, 2015), porém, existem relatos também em outras regiões do Brasil (Maguire et al., 1986; Shikanai-Yasuda et al., 1991; Steindel et al., 2008; Bastos et al., 2010) e em outros países latino americanos (Noya et al., 2010; Ramírez et al., 2013; Blanchet et al., 2014). A doença de Chagas está incluída no grupo de doenças transmitidas por via oral e os programas de controle devem ser ajustados para este novo cenário epidemiológico (OPAS, 2014).

Inicialmente associada à população rural, a doença de Chagas sofreu entre as décadas de 70 e 80 um processo de urbanização, seguido de emigração para

regiões não endêmicas como América do Norte, Europa, Ásia e Austrália (Schmunis, 2007; Schmunis & Yadon, 2010; Jackson et al., 2014). Cerca de 3,5 milhões de latino-americanos vivem na Europa, com uma estimativa de 90.000 indivíduos infectados, cerca de 50% na Espanha (Figura 1.1) (OMS, 2010; Gascon et al., 2010). Nestes países a transmissão da doença de Chagas está associada à via congênita, transfusões de sangue e transplantes de órgãos (Rodríguez-Guardado et al., 2015; revisto em Bern et al., 2011).

Na América Latina, a estratégia de eliminação de vetores, iniciada nos anos de 1980 como forma de controle da doença de Chagas, foi insuficiente. São necessárias a implementação de políticas de educação comunitária, seja por melhoria na estrutura de moradias e em práticas de educação sanitária, também colaboram para ações preventivas, visto que a doença, como toda antropozoonose, dificilmente será erradicada, devido a diversidade de vias de transmissão, vetores e espécies reservatórias (revisto em Coura & Dias, 2009; Coura, 2015; Sosa-Estani & Segura, 2015).

### **1.3. Diagnóstico e tratamento**

Na fase aguda da doença, onde há a presença do parasito na corrente sanguínea, o diagnóstico pode ser realizado por detecção direta do parasito por microscopia de luz, gota espessa, hemocultura, xenodiagnóstico e PCR, sendo esta última técnica a mais sensível, porém menos utilizada nessa fase (OMS, 2002; Bern et al., 2009; Dubner et al., 2008). Com a redução do número de parasitos circulantes a níveis subpatentes na fase crônica, diagnóstico individual é baseado na análise de

anticorpos contra o antígeno de *T. cruzi* por imunofluorescência indireta, hemaglutinação, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e PCR (Berrizbeitia et al., 2006; Brasil et al., 2010). A OMS preconiza o uso de pelo menos duas técnicas com resultados positivos para o diagnóstico (revisto em Lescure et al., 2010). Tanto em bancos de sangue como em caso de suspeita de infecção, é necessária a confirmação por, ao menos, dois métodos, sejam estes sorológicos ou observação do protozoário (Granjón et al., 2016).

Desde o final da década de 1960, Nifurtimox (Nif) e Benznidazol (Bz) são usados no tratamento etiológico da doença de Chagas (revisto em Coura & De Castro, 2002; Bern, 2011). Dentre os efeitos adversos observados nos pacientes, destacam-se náuseas, fraqueza, dores de cabeça, dermatites, dores gastrointestinais, efeitos neurológicos dentre outros, o que pode levar a interrupção do tratamento (revisto em Keenan & Chaplin, 2015; Pinazo et al., 2010; Jackson et al., 2010; Perez-Molina et al., 2012). Em contrapartida, crianças têm uma tolerância ao tratamento bem maior (OMS, 2002; Dias et al., 2016). A eficácia dos tratamentos varia com a fase da doença (na fase crônica ainda é contenciosa sua eficácia), idade (crianças na fase aguda respondem melhor) ou área geográfica do paciente, dose e duração do tratamento. Estas drogas apresentam uma taxa de cura de mais de 95% em casos congênitos, 60-80% em adultos na fase aguda e 60-70% na fase indeterminada (Urbina, 2010).

Na última década, diversos grupos realizaram estudos com pacientes avaliando o tratamento da doença. Um desses estudos, publicado em 2015, o estudo randômico com mais de 2800 pacientes cardiopatas (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis – BENEFIT*) indicou que pacientes tratados com o Bz

apresentavam menor detecção do parasito (avaliada por ensaios sorológicos e PCR), todavia não demonstrou correlações com alterações clínicas cardíacas como taquicardias, arritmias ou morte (Morillo et al., 2015; revisto em Salomão & De Castro, 2017). Contudo, esse projeto, por englobar pacientes de diferentes regiões geográficas e características populacionais amplas, apresenta ressalvas quanto a importância do tratamento do paciente crônico com Bz (Rassi Jr et al., 2017). Além disso, ensaios com coortes menores ainda sugerem melhoras nos pacientes crônicos tratados e, tanto a OMS quanto o Médicos Sem Fronteiras (MSF) preconizam o tratamento de pacientes nesta fase (Fragatta-Filho et al., 2016; OMS, 2017; MSF, 2017). A ausência de um tratamento eficaz na fase crônica, associada a melhorias nas condições do paciente reiteram a necessidade do estudo de novos compostos, assim como o reposicionamento de fármacos na doença de Chagas (Pecoul et al., 2016). Grande parte dos compostos testados nos ensaios pré-clínicos ou clínicos atualmente focam principalmente em inibidores da biossíntese de esterol, de cisteíno-proteases, metabolismo de pirofosfato ou enzimas do metabolismo redox do parasito, incluindo a combinação e reposicionamento de fármacos já disponíveis (revisto em Salomão & De Castro, 2017). Ainda, a inclusão na dieta de Selênio (presente por exemplo, em castanhas) como terapia adjuvante tem sido bastante debatida e já usada em ensaios pré-clínicos na tentativa de reduzir a progressão da cardiopatia crônica (Rivera et al., 2002; Jelicks et al., 2011; Alvarenga Americano do Brasil et al., 2014).

#### 1.4. Fases da doença de Chagas

A doença de Chagas ocorre em duas fases, aguda e crônica (OMS, 2002; Dias et al., 2016). A fase aguda na via vetorial clássica é caracterizada pela presença de parasitos circulantes na corrente sanguínea e costuma ser assintomática. Porém, as pessoas podem apresentar náusea, diarreia, vômito, febre, irritação cutânea e da meninge. Comumente é encontrado, no local do inóculo, uma lesão inflamatória denominada chagoma de inoculação ou sinal de Romaña (quando a lesão é na região de mucosa).

Na fase aguda, podem ocorrer ainda linfadenopatia, conjuntivite, hepatoesplenomegalia e alterações de exames laboratoriais como trombocitopenia, anemia e aumento de transaminases hepáticas e enzimas cardíacas (creatina quinase isoforma B – CK-MB). São relatados aumento na expressão das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e proteína C reativa. Miocardite, bloqueio atrioventricular (AV), arritmias e cardiomegalia são danos mais severos pouco observados em pacientes na fase aguda, contudo tornam-se mais frequentes em casos de infecção via oral. Observa-se, ainda, que alterações elétricas como baixa voltagem QRS, fibrilação atrial e modificações na repolarização ventricular estão presentes nos pacientes nessa fase (revisto em Prata, 2001).

Na fase aguda, a mortalidade é pequena se a transmissão considerada for a vetorial clássica, porém pode ocorrer em situações de imunossupressão ou em crianças, por conta da cardite ou meningoencefalite (Rassi et al., 2012; Keating et al., 2015; revisto em Tanowitz, 2009; Tanowitz et al., 2015). Sem tratamento,

aproximadamente 5-10% dos pacientes morrem na fase aguda por encefalomielite ou insuficiência cardíaca, principalmente crianças (revisto em Prata, 2001; Yacoub et al., 2008).

Após 2-3 meses, a infecção entra na fase crônica indeterminada, controlando a parasitemia e sem manifestações clínicas evidentes, eletrocardiograma (ECG) e exames radiológicos normais. Grande parte das pessoas infectadas permanecem nesta fase. Dentre os mecanismos para tal resposta, há a intensa produção de citocinas como IL-10 e IL-17 (Souza et al., 2004; revisto em Dutra et al., 2009, 2014). Muitos anos ou décadas após o início da infecção, mais de 1/3 dos indivíduos, desenvolvem a forma sintomática crônica, com aproximadamente 35% com alterações cardíacas, cerca de 15% desenvolvem forma digestiva e em menor proporção (menos de 5%) alterações neurológicas (revisto em Prata, 2001). A forma digestiva é caracterizada por inflamação crônica e destruição de neurônios parassimpáticos, levando a um progressivo aumento do esôfago ou colón (Rezende & Moreira, 1988; Peñaranda-Carrillo et al., 2006; Matsuda et al., 2009).

Independente da forma apresentada, a relação entre a resposta imune do hospedeiro e o parasito é crucial para a patogênese. A infecção leva a mudanças no sistema imune do mamífero como a ativação policlonal de linfócitos T e B (Minoprio et al, 1986 a, b). Enquanto grande parte dos linfócitos B não apresentam especificidade para antígenos do parasito, as células T CD4 possuem amplo repertório de ligantes para sua expansão clonal (Minoprio et al., 1988; Minoprio & Coutinho, 1988).

Primariamente, a cardiopatia nos pacientes crônicos era descrita como uma resposta autoimune, posteriormente associado a diferentes características multifatoriais, persistência do parasito e interação variável entre patógeno e hospedeiro (revisto em Lescure et al., 2010). Uma das razões pelas quais a hipótese de autoimunidade foi aceita era que mesmo com os sinais da doença no tecido, não havia a presença aparente do parasito. Assim, o mimetismo molecular entre parasito e antígenos do hospedeiro, liberação de antígenos crípticos e ativação linfocítica policlonal suportavam tal teoria. Adicionado a isso, a reação cruzada de diversos antígenos com o parasito, como por exemplo a miosina cardíaca de cadeia pesada, que reage com cruzipaina e proteína B13 a embasavam, embora isso não seja suficiente para a sua caracterização como doença autoimune (Bonney et al., 2011; revisto em Machado et al., 2012; Esper et al., 2015).

Todavia, ensaios de PCR (reação de cadeia polimerase) e hibridização *in situ* do tecido cardíaco demonstraram a persistência do parasito no local da doença, suportado por resultados experimentais e clínicos que já demonstravam a gravidade da doença associado à observação do parasito em sítios próximos ao coração (Higuchi et al., 1986; Vago et al., 1996; Anez et al., 1999; Zhang & Tarleton, 1999; revisto em Higuchi et al., 2003).

#### *1.4.1. Cardiomiopatia chagásica*

A gravidade está associada à ocorrência da miocardite, correlacionada ao infiltrado inflamatório, que é majoritariamente composto de linfócitos T, com perfil Th1



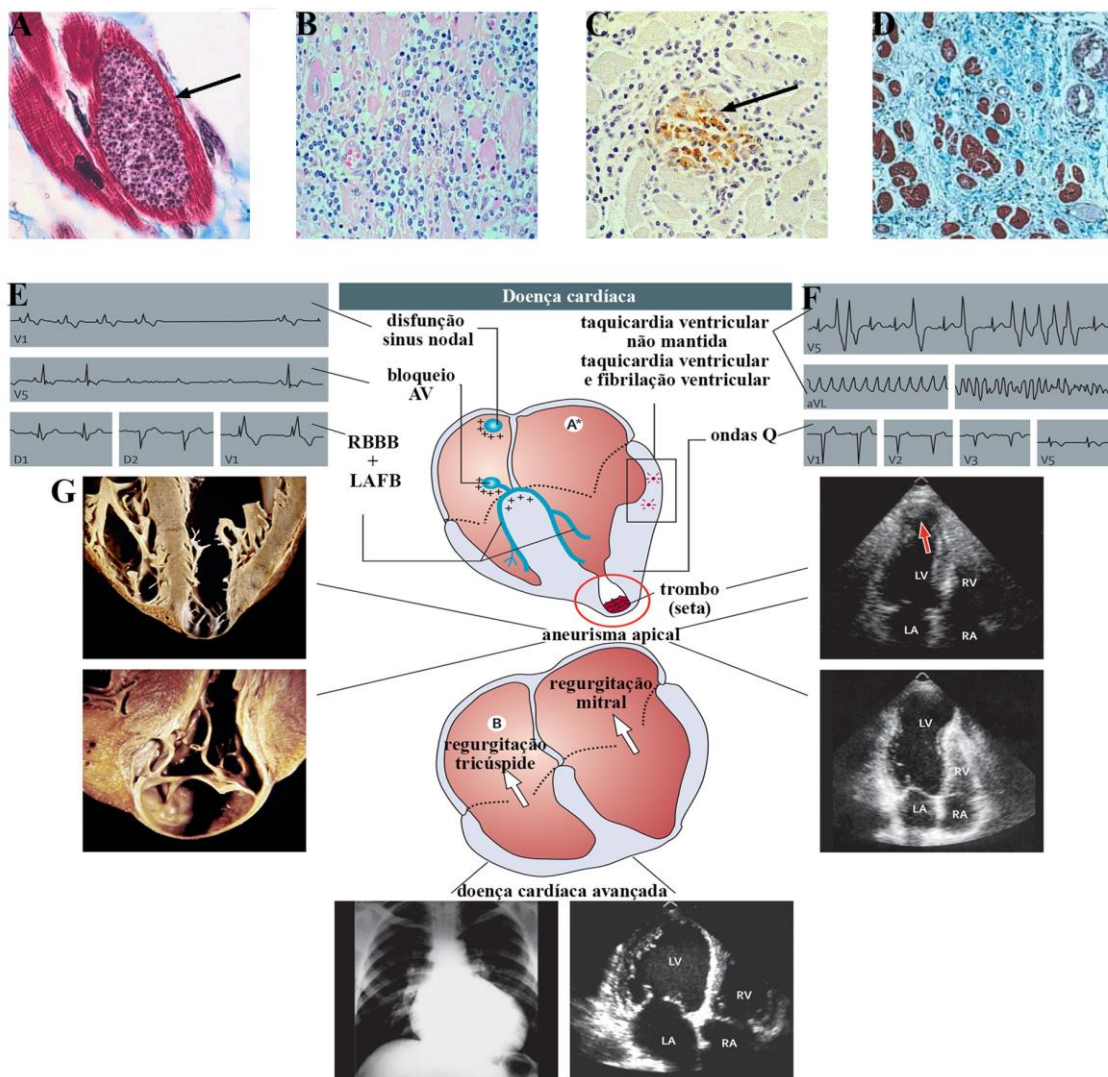
e macrófagos (Higuchi et al., 1993a, 1993b; Morato et al., 1998; revisto em Cunha-Neto & Chevillard, 2014). Tanto na fase aguda como crônica, o coração apresenta os maiores danos, muito embora os mecanismos de patogênese envolvidos nesse tecido ainda não estejam completamente elucidados. Nos pacientes sintomáticos crônicos, grande parte desenvolve cardiomiopatia dilatada, com disfunção ventricular, falha cardíaca e arritmia.

A cardiomiopatia chagásica consiste na manifestação clínica mais importante da doença de Chagas, pela frequência, gravidade e impacto na morbidade e mortalidade. O curso clínico é variável, entretanto, quando presente, o prognóstico costuma ser mais grave que as cardiopatias idiopáticas (Bestetti & Muccillo, 1997). A miocardite envolve danos no sistema de condução e nas câmaras e a progressão do dano miocárdico é classificado, segundo a Diretriz Latino-Americana para diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica (Andrade et al., 2011), em 5 estágios, baseados nas alterações no ECG diretamente associadas ao avanço da patologia. No estágio A, os pacientes não apresentam alterações na função cardíaca, e sem sintomas. Em B1, os pacientes apresentam alterações eletrocardiográficas, com distúrbios de condução e arritmias, com função ventricular não alterada. Em B2, apresenta disfunção ventricular global (fração de ejeção do ventrículo esquerdo). Para os pacientes no estágio C, além da alteração de fração de ejeção, há os sintomas de insuficiência cardíaca. E, em D, a insuficiência cardíaca é observada nos pacientes em repouso. De modo geral, os piores prognósticos estão associados ao agravamento da arritmia (bradicardia e taquicardia) e perfusão miocárdica, visto que, estabelecido o remodelamento e danos no ventrículo esquerdo, ativações neuro-humorais levam

ao ciclo de hipertrofia e situações isquêmicas comuns as demais cardiopatias. O aneurisma apical, fibrilação atrial, bloqueio AV, baixa fração de ejeção do ventrículo esquerdo, disfunções sinus nodal e disautonomia são algumas características observadas na cardiopatia chagásica. Recomenda-se o tratamento, associado aos agentes tripanocidas, de diuréticos, inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), bloqueadores do receptor da angiotensina, beta-bloqueadores adrenérgicos (BBA) e outros antiarrítmicos, como a amiodarona (Figura 1.3) (Andrade et al., 2011; Dias et al., 2016).

Morfologicamente, a cardiomiopatia é caracterizada um grande número de miofibras hipertróficas e fibrose, associado a um intenso infiltrado inflamatório, com células mononucleares, tanto na fase aguda como crônica. Há ainda um edema intersticial e uma dilatação vascular e capilar. Pela célula cardíaca também são liberadas NO, citocinas e quimiocinas que atraem células imunes para o sítio inflamatório. Os macrófagos possuem um importante papel de fagocitose no controle da infecção na fase aguda, como demonstrado com a depleção dessas células por sílica ou quando exacerbado por estimulação com fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e IFN- $\gamma$  (Higuchi et al., 1987; Melo, 1999; Melo & Machado, 2001).

Os linfócitos T CD8 também participam do infiltrado inflamatório. Sugere-se que a quimiocina CCL2 (também conhecida como proteína quimiotática de monócito 1 - MCP-1) atua no recrutamento desta população linfocitária no miocárdio infectado (Paiva et al., 2009). A participação de células CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>perforina<sup>-</sup> diminui o dano cardíaco, enquanto CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>perforina<sup>+</sup> aumentam a lesão. Assim como linfócitos T



**Figura 1.3. Cardiomiopatia chagásica.** (A-D) Características histopatológicas: (A) ninho de amastigotas (seta) na fibra miocárdica sem reação inflamatória (corado com tricômio de Masson, 100x de aumento), (B) miocardite severa com diversos linfócitos sem a proximidade de cardiomiócitos infectados (corado com HE, 40x de aumento), (C) macrófagos contendo antígenos de *T. cruzi* (seta) em arranjo granulomatoso (reação de imunoperoxidase, 40x de aumento), (D) fibrose difusa do miocárdio, sugestivo de injúria isquêmica (tricômio de Masson, 20x de aumento). (E-G) Sintomatologia da doença cardíaca: (E, F) alterações eletrocardiográficas são observadas como disfunção sinus nodal, bloqueio AV (atrioventricular), bloqueio do ramo direito e hemibloqueio anterior esquerdo (RBBB + LAFB), batimentos prematuros, taquicardia ventricular e alterações nas ondas Q, (G) observa-se aneurisma apical dilatado e trombo (seta). Com a progressão da doença, aumento do miocárdio pode ser observado na radiografia, além de alteração da função sistólica do ventrículo esquerdo pelo ecocardiograma (Adaptado de Higuchi et al., 2003; Rassi Jr et al., 2010).

CD4, granzimas e outras moléculas citotóxicas produzidas por células T CD8 atuam no controle da infecção e da resposta inflamatória (revisto em Henriques-Pons & Gomes, 2013).

### **1.5. A infecção pelo *T. cruzi* – interação com a célula hospedeira**

Ao entrar na corrente sanguínea do mamífero, o protozoário inicia o contato com diversas moléculas do hospedeiro que irão participar da entrada do parasito na célula. As diferentes formas do parasito, suas cepas, além do tipo celular do mamífero influenciam diretamente na expressão de moléculas de superfície, que realizarão a adesão e reconhecimento, sinalização e internalização do patógeno na célula hospedeira (revisto em Barrias et al., 2013).

Muitas glicoproteínas (gp), mucinas, transialidases (TS) estão presentes na superfície do *T. cruzi* para possibilitar o contato com a célula hospedeira. Nos tripomastigotas metacíclicos, por exemplo, são expressas gp82, gp30, gp90 ou gp35/50 e proteínas secretadas da família SAP (ricas em resíduos de serina, alanina e prolina), enquanto em tripomastigotas de cultura foram descritos outras moléculas como a gp85, além de enzimas para degradação de conteúdos da matriz extracelular como a prolil oligopeptidase 80kDa (POP Tc80), cruzipaina, oligopeptidase B, superfamília das gp/transialidades Tc-85, Tc-1 (Baida et al., 2006; Santana et al., 1997; revisto em Yoshida, 2006; Alves e Mortara, 2009). Na célula hospedeira, são descritos como alvos da ligação parasito-hospedeiro desde receptores de carboidratos - galactosil, manosil, resíduos de ácido siálico, resíduos de lectina como

a galectina-3, receptores de endotelina-1 e bradicinina, receptores de fator de citocinas como transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e “toll-like” (TLRs 2, 4 e 9), como também regiões de domínios lipídicos específicos (balsas lipídicas e regiões ricas em colesterol) (Waghbi et al., 2005; Bafica et al., 2006; Fernandes et al., 2007; Hissa & Andrade, 2015; Machado et al., 2014; revisto em Villalta et al., 2009). Grande parte destas moléculas participa de mecanismos de aumento do cálcio intracelular (tanto da célula hospedeira como também do protozoário), necessários para a fusão do vacúolo parasitóforo (VP) com o lisossomo (Tardieux et al., 1992). A ativação de proteínas como a fosfatidilinositol-4,5 bifosfato-3 quinase (PI3K) e a fosfolipase C (PLC) levam a geração de produtos como a diacilglicerol (DAG) e a inositol-3-fosfato (IP<sub>3</sub>). O IP<sub>3</sub>, por sua vez, promove a liberação do Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático (Ferreira et al., 2006; Maeda et al., 2012). Essa variação do influxo do íon e de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) auxiliam na entrada, seja ativa ou passivamente pelo parasito (Tardieux et al., 1992).

A fagocitose, processo de internalização de partículas incluindo o *T. cruzi*, ocorre com mobilização de actina por diversos ligantes (como por exemplo, receptores de reconhecimento de padrões – PRRs), e acontece em alguns tipos celulares, como macrófagos, células dendríticas e outros fagócitos. Com a utilização de citocalasina B, um inibidor de polimerização de filamentos de actina, foi observada uma menor internalização de formas tripomastigotas em macrófagos peritoneais, células de linhagem HeLa (célula epitelial humana de colo uterino) e L929 (fibroblasto subcutâneo murino C3H/An). Em fagócitos não-profissionais, como as células cardíacas, pseudópodes são emitidos pela célula hospedeira em proximidade ao

patógeno para sua internalização (Nogueira & Cohn, 1976; Barbosa & Meirelles, 1995). Parte desses receptores mencionados anteriormente, como TLRs, receptor de TGF-  $\beta$  atuam induzindo a fagocitose de formas tripomastigotas e amastigotas (Ley et al., 1988; Hall et al., 1992; Shenkman & Mortara, 1992; Vieira et al., 1994; Procópio et al., 1999; Mortara et al., 2005, Albertti et al., 2009; Barrias et al., 2010).

Células fagocíticas e não-fagocíticas profissionais também se utilizam de regiões ricas em colesterol, além de domínios lipídicos associados às cavéolas e a flotilinas, que são estruturalmente semelhantes às caveolinas. Há descrito também a participação de endocitose mediada por clatrina e macropinocitose para a internalização de *T. cruzi*, processos estes que também envolvem a mobilização de filamentos de actina (Nagajyothi et al., 2011; Barrias et al., 2012).

O sucesso da infecção depende da presença dos lisossomos, criando um ambiente ácido, propício para iniciar a diferenciação da tripomastigota na forma replicativa amastigota. Há algumas variações entre os tipos celulares utilizados, descrevendo essa fusão no início do contato do parasito com a membrana plasmática, com a exocitose do conteúdo dos lisossomos, ou ainda uma fusão posterior do VP com a organela no interior da célula hospedeira (Ley et al., 1990; Woolsey & Burleigh, 2004; Fernandes et al., 2011; Hissa et al. 2012; revisto em Andrade & Andrews, 2005; Burleigh, 2005). A fusão lisossomal, inicial ou tardia, é dependente de PI3K, que também auxilia na regulação do citoesqueleto, captação de glicose e fusão endossomal. A endocitose também ocorre na internalização do parasito, demonstrado pela presença de proteínas endossomais como as proteínas GTPásicas Rabs e a antígeno de endossomo inicial 1 (EEA1) nos VPs (Wilkowsky et al., 2002; Woolsey et

al., 2003; Andrade & Andrews, 2004; Batista et al., 2006; Martins et al., 2011; revisto em Maeda et al., 2012).

Muitos mecanismos estão envolvidos na invasão do protozoário e dados de transcriptômica descrevem até o momento o remodelamento do citoesqueleto, ciclo celular, morte celular - apoptose, biossíntese de lipídios e metabolismo oxidativo de parasito e hospedeiro (Vaena de Avalos et al., 2002; Manque et al., 2011; Li et al., 2016). A produção de ROS consiste numa das defesas do organismo contra patógenos e, no caso da infecção por *T. cruzi* essa participação mostra-se controversa, ora porque os parasitos se utilizam do estresse oxidativo para aumentar a virulência e infectar macrófagos, ora há indicativos que as formas amastigotas em contato com ROS são eliminadas pelos mesmos macrófagos, a depender da forma do parasito e macrófago usado (Nathan et al., 1979; Paiva et al., 2012; Góes et al., 2016; revisto em Piacenza et al., 2009; Paiva & Bozza et al., 2014; Machado-Silva et al., 2016).

No citoplasma, as formas amastigotas realizam a multiplicação por fissão binária e utilizam os nutrientes da célula para crescimento e nova diferenciação em tripomastigotas. A disseminação do protozoário no organismo ocorre via corrente sanguínea e vasos linfáticos, sendo possível a infecção de quaisquer células nucleadas. Há, no entanto, uma tendência de infecção de células do sistema reticulo-endotelial, adiposo, nervoso, muscular, inclusive cardíaco (Teixeira et al., 1997; Viotti et al., 2006).

Diferentes processos celulares podem afetar diretamente o curso de infecção. No caso da doença de Chagas, por exemplo, a ativação de células fagocíticas como os macrófagos, a produção de citocinas como o IFN- $\gamma$  e a ativação por antígenos, dentre outros. Assim, há a proposta de que vias intracelulares como a autofagia atuem tanto na destruição de microrganismos como na regulação de moléculas participantes da infecção (revisto em Deretic & Levine, 2009).

## 2. Autofagia

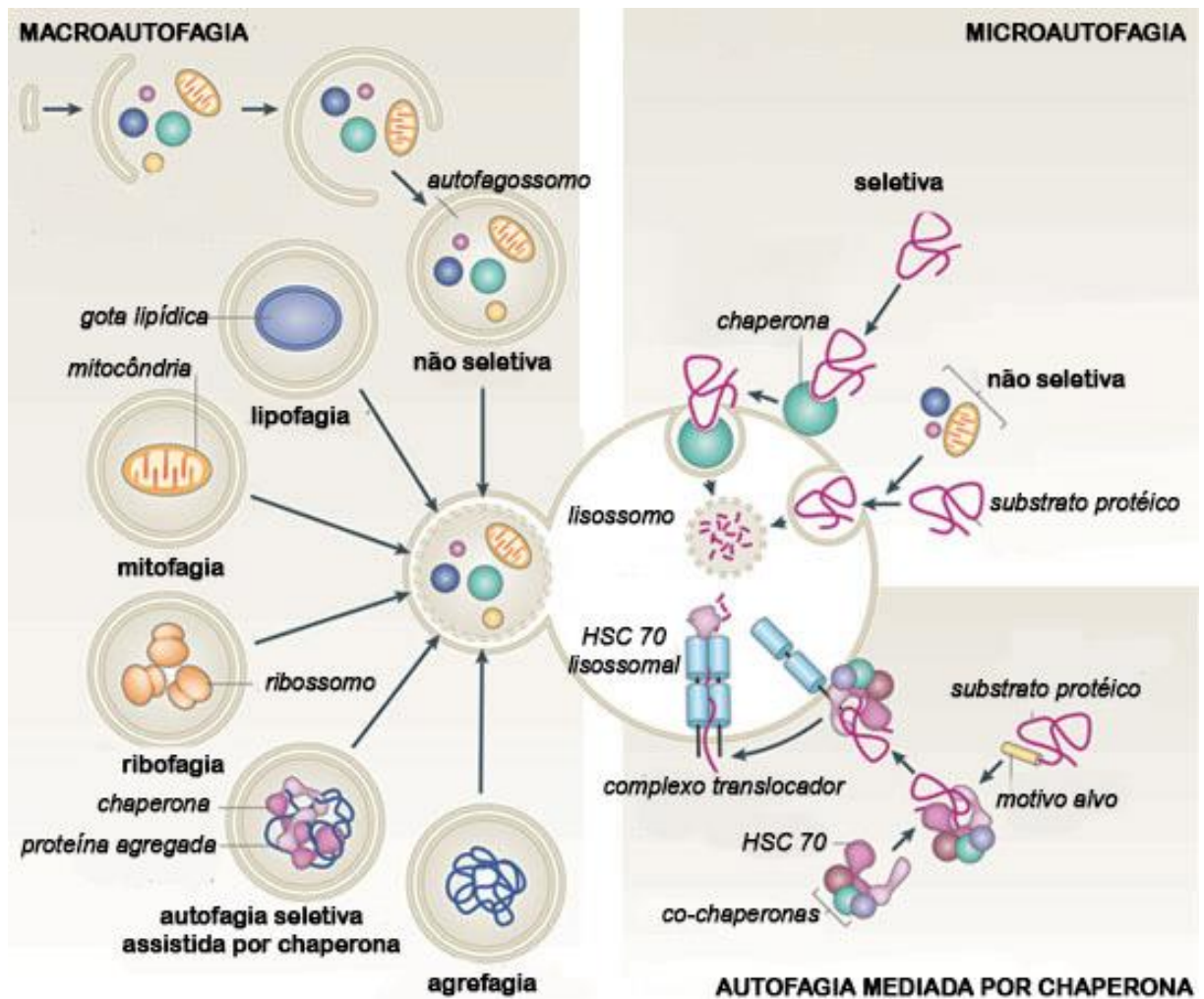
Na década de 1960, diversos pesquisadores definiram termos envolvendo uma recém-descoberta organela - o lisossomo (Duve, 1963). Além de iniciarem os estudos bioquímicos e a descoberta de suas diferentes funções, observadas principalmente por microscopia eletrônica, foram cunhados termos como endocitose, exocitose e autofagia (do grego, “comer a si mesmo”) (Klionsky, 2008). A autofagia é definida como a degradação de componentes citoplasmáticos, como macromoléculas e organelas, realizada através do lisossomo. Contudo, estudos iniciais envolvendo autofagia, se baseavam apenas em análises por microscopia eletrônica. Apenas na década de 1990, o grupo do Dr. Ohsumi descreveu genes relacionados à autofagia (ATG – *autophagy-related genes*), o que permitiu a melhor compreensão do processo autofágico e suas interfaces com diversos processos biológicos, e com isso, foi laureado em 2016 com o prêmio Nobel de Medicina (Tsukada & Ohsumi, 1993; revisto em Levine & Klionsky, 2017).



As células eucarióticas realizam autofagia constitutivamente, sendo que este processo pode ser exacerbado em condições de baixa nutricional como a depleção de glicose, aminoácidos ou com uso de fármacos (revisto em Ballou & Lin, 2008). A manutenção da homeostase e controle de qualidade intracelular realizada tanto pela autofagia como pelo sistema de ubiquitina-proteassomo permitem a reciclagem de componentes e aumento da sobrevivência celular (revisto em Kaur & Debnath, 2015). Além disso, diferentes processos biológicos participam da indução e/ou inibição da via autofágica, direta ou indiretamente, podendo levar a um aumento da produção de citocinas e ROS, por exemplo. O desequilíbrio desses mecanismos homeostáticos, exacerba a autofagia, que pode culminar na morte celular, seja pela morte autofágica ora por outros tipos de morte celular como a apoptose e necrose, realizando a integração de processos (Yu et al., 2004; Iyer et al., 2009; Bray et al., 2012).

## **2.1. Tipos de autofagia**

Nos últimos anos, a maquinaria autofágica tem sido extensivamente estudada em mamíferos. Nesses organismos já foram descritos diferentes tipos de autofagia, destacando-se autofagia mediada por chaperona (AMC), microautofagia e a macroautofagia, detalhados a seguir (Figura 1.4).



**Figura 1.4. Tipos de autofagia em mamíferos.** A macroautofagia necessita de uma estrutura de dupla membrana – autofagossomo – para a degradação de proteínas e/ou organelas, recebendo nomes específicos para organelas, como mitofagia, lipofagia, ribofagia ou situações envolvendo chaperona ou agregados proteicos. A microautofagia é a degradação direta de componentes, de modo seletivo ou não, pelo lisossomo. A autofagia mediada por chaperona requer o translocamento da proteína com sequência-sinal por um complexo de chaperonas e co-chaperonas para o lisossomo (Adaptado de Cuervo, 2011).

### 2.1.1. Autofagia mediada por chaperona

A autofagia mediada por chaperona ocorre por uma internalização direta de proteínas pelo lisossomo. O reconhecimento das proteínas a serem degradadas ocorre no citosol por complexo de chaperonas que as direcionam ao lisossomo (revisto em Mejeski & Dice, 2004). Este reconhecimento se dá devido à presença de

uma sequência de aminoácidos nas proteínas alvo, que, ao estar exposto, apresenta afinidade por um complexo de proteínas constituído de: hsc70, proteína de choque térmico 40kDa (hsc40), proteína de interação a hsc70 (hip), proteína de organização hsc70-hsc90 (hop) e de uma proteína atanogena associada a Bcl-2 (bag-1). Esse complexo de chaperonas e proteína-alvo se liga a Lamp-2A (proteína de associação à membrana lisossomal 2A), responsável por translocar a proteína alvo para o interior do lisossomo (revisto em Cuervo, 2009). O primeiro motivo de aminoácidos com esta função previsto apresentava a sequência KFERQ (lisina, fenilalanina, ácido glutâmico, arginina e glutamina) (Dice et al., 1990). Entretanto, outras sequências também foram descritas, sendo constatado que estas consistem de: (i) um aminoácido glicina precedendo quatro aminoácidos - um básico, um ácido, um hidrofóbico, um repetido básico ou hidrofóbico; (ii) um ou dois resíduos de carga positiva (como lisina e arginina), um ou dois com resíduos hidrofóbicos (isoleucina, leucina, valina, fenilalanina), um com carga negativa (ácido aspártico e ácido glutâmico) e glutamina em uma das extremidades do pentapeptídeo (Pedrozo et al., 2013; revisto em Mejieski & Dice, 2004). Esses motivos possíveis de degradação pela autofagia mediada por chaperona estão presentes em 30% das proteínas citosólicas, todavia mais motivos na mesma proteína não necessariamente direcionam para tal via de degradação (Chiang et al., 1989; revisto em Kaushik & Cuervo, 2012).

### 2.1.2. *Microautofagia*

Descrita primeiro em mamíferos, a microautofagia compreende a invaginação da organela e degradação de componentes, tendo sido observada em lisossomos e peroxissomos (revisto em Mijaljica et al., 2011). Endossomos e corpos multivesiculares demonstraram esta internalização em condições de estresse nutricional e estariam associados à proteína de choque térmico 70kDa (hsc70) e ESCRT I e III (proteínas do complexo endossomal de direcionamento de transporte) (Sahu et al., 2011; Kawamura et al., 2012). Mais recentemente, foi observado em *Drosophila*, que Atg1 e Atg13 também participam da microautofagia endossomal, associada ao estresse nutricional, sensíveis a inibição de mTOR (Mukherjee et al., 2016). Já em leveduras, o processo foi observado em diversos compartimentos, degradando tanto proteínas como conteúdo lipídico. Parece que o processo pode ser seletivo, visto a participação de Vac8, uma proteína de ancoragem presente nos vacúolos, essencial para a microautofagia fragmentada do núcleo (PMN, do inglês "*piecemeal microautophagy of nucleus*") ou micronucleofagia (Roberts et al., 2003). Além disso, proteínas Atg também foram relatadas na via da microautofagia, sendo descritas em leveduras as Atg 1-Atg10, Atg 12-Atg16, Atg 8 e Atg 22 (revisto em Inoue & Klionsky, 2010).

### 2.1.3. *Macroautofagia*

A macroautofagia consiste no englobamento de organelas e/ou macromoléculas por uma membrana dupla (fagóforo) que serão direcionadas para o

lisossomo para degradação. A descoberta das proteínas Atgs, envolvidas na sua via, justifica ser o mecanismo mais estudado dentre os tipos, comumente referido como autofagia. Nestas, destaca-se a proteína LC3 (proteína cadeia leve 3, também conhecida como Atg8 em leveduras e demais eucariotos), que compõe a dupla membrana formada durante a macroautofagia denominada autofagossomo (Kabeya et al., 2000; revisto em Tanida, 2011),

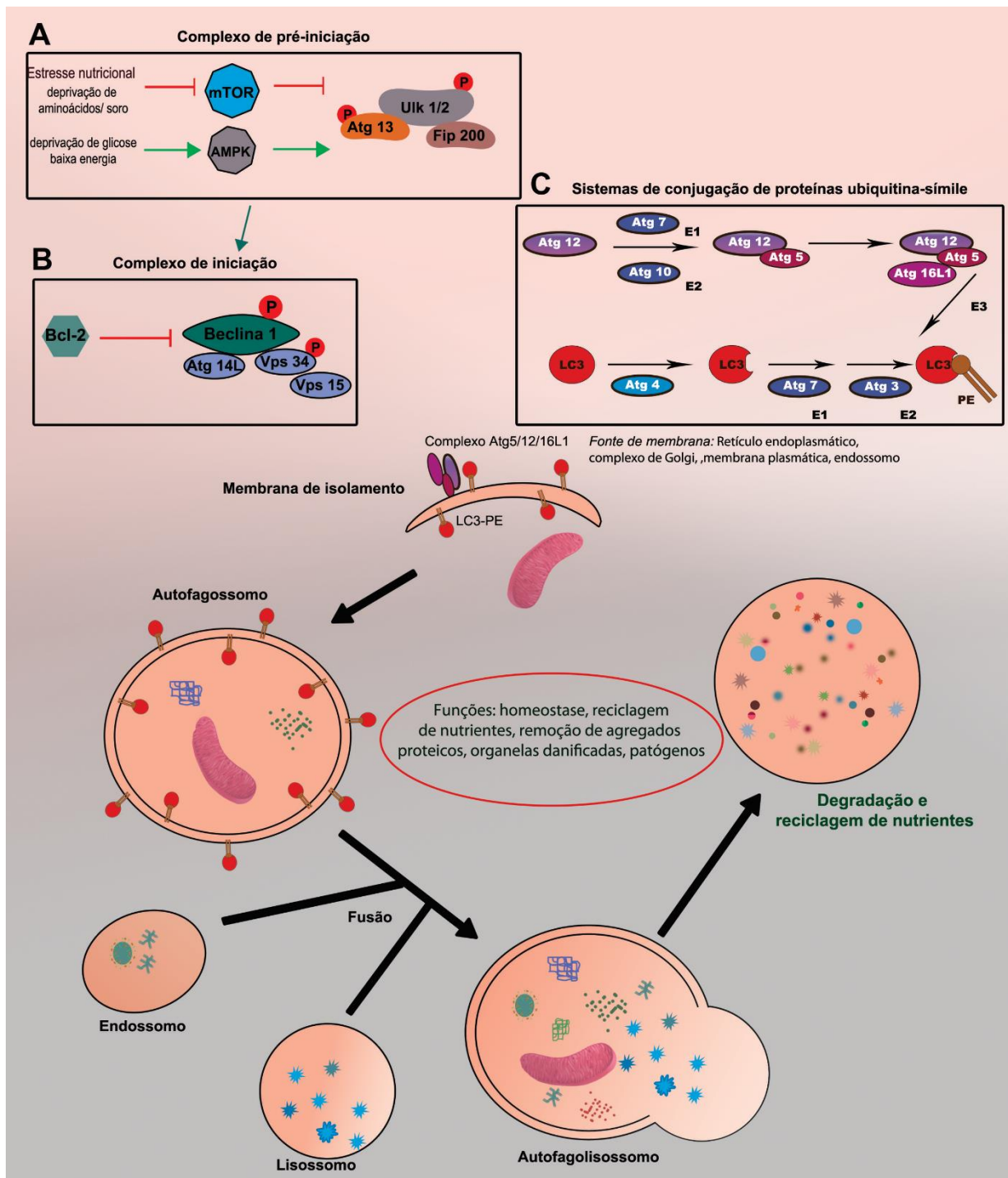
Na Figura 1.5, representa-se o esquema de proteínas e mecanismos envolvidos na macroautofagia em mamíferos.

A autofagia é um processo constitutivo que pode ser exacerbada em algumas condições. A macroautofagia, para iniciar, pode requerer uma condição adversa, um estresse que irá sinalizar a ativação de diversas proteínas Atgs. Dentre esses, a deprivação de nutrientes, como os aminoácidos, inativa a proteína mecanística alvo da rapamicina (mTOR). Essa proteína é uma serino/treonina quinase e se apresenta formando dois complexos proteicos: mTORC1 e mTORC2. O mTORC1 é composta pelas proteínas Raptor, mLST8 (proteína associada a mTOR) e mTOR, enquanto mTORC2 contém Rictor, mSIN1 (quinase associada a ativação por mitógeno 1), PRR5 (proteína prolina rica 5), mLST8 e mTOR. Na ausência de aminoácidos, por exemplo, há a desfosforilação do complexo mTORC1, levando à sua inativação. Situações de baixa energética como menor aporte de glicose também interferem direta e indiretamente em mTOR, pela sinalização de AMPK [quinase ativada por AMP (5' adenosina monofosfato)] (revisto em Wullschleger et al., 2006). Uma outra forma de inativação é pelo uso de fármacos como a rapamicina e torina, que se associam a subunidade FKBP12 (ligante de FK506) de mTOR no complexo 1 (revisto em Hall,

2008). A inativação de mTORC1 ou a ativação de AMPK, outra proteína sensora de nutrientes, leva ao recrutamento do primeiro complexo envolvido na macroautofagia, o complexo de pré-iniciação - ULK (“Unc-like kinase”, ou Atg1 em leveduras) (ULK1/2, FIP200, Atg13 e Atg101). O complexo ULK, em condições de estresse, se dissocia do complexo mTORC1 e há a desfosforilação dos sítios de ULK1 e Atg13, porém a ULK1 ativa é capaz de se autofosforilar e fosforilar Atg13 e FIP200 (proteína de interação com ULK), iniciando formação do autofagossomo (Figura 1.5A) (revisto em Wesselborg & Stork, 2015). A proteína ULK interage com diferentes proteínas como Atg101 ou Hsp90 e CDC37, atuando também na fosforilação da Atg14 e do complexo beclina-1 (Park et al., 2016).

A primeira nucleação membranar, o omegassomo, apresenta sítios efetores de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P), dentre estes o ULK, localizado no retículo endoplasmático, sugerindo assim sua origem. O alongamento da membrana do fagóforo, entretanto, pode acontecer através de outras estruturas membranares, como a mitocôndria, o Golgi ou até mesmo a membrana plasmática (revisto em Lamb et al., 2013; Ktistakis & Tooze, 2016).

O complexo de iniciação – complexo da beclina-1 ou PI3K-classe III - é essencial para o direcionamento de membranas para o autofagossomo. Composto pelas proteínas beclina-1 (Atg 6 em leveduras), Vps34 (proteína de endereçamento vacuolar, “*Vacuolar protein sorting*” 34), Vps15 e Atg14L, o complexo é responsável por recrutar proteínas com afinidade a fosfatidilinositol, como WIPI (domínio de repetição WD ou Atg18 em leveduras) ou zFYVE1 (proteína com dedos de zinco com



**Figura 1.5. Macroautofagia em células de mamíferos.** (A) Com a indução por estresse nutricional ou rapamicina, ocorre a ativação de complexos pré-iniciação (ULK, Atg13, Fip200) que formam a estrutura inicial, (B) junto ao complexo proteico de iniciação (Beclina-1, Vps34, Vps15, Atg14L), direcionando membranas para englobar o material. (C) Dessa forma, os sistemas ubiquitina símile realiza a conjugação das proteínas Atg5/12/16L e de LC3 a fosfatidiletanolamina (PE), na membrana de isolamento. A partir disso, forma-se o autofagossomo, no qual a LC3 é mantida tanto na membrana interna como na externa. O autofagossomo pode se fusionar a endossomos e, posteriormente se une ao lisossomo para degradação do material, reciclando nutrientes (Adaptado de Deretic & Levine, 2009).

domínios ricos em cisteína 1), que, por sua vez, auxiliam nos sistemas de conjugação de ubiquitina (Figura 1.5B) (revisto em Proikas-Cézanne & Codogno, 2011).

Além disso, a associação das proteínas beclina-1, Vps34 e UVRAG [proteína associada a resistência da radiação ultravioleta], diminui a expressão de Rubicon, uma proteína que se associa a beclina-1, regula negativamente a autofagia. Outra regulação negativa possível é a associação de beclina-1 a proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 (linfoma 2 de célula B) – Bcl-2, Mcl-1 (regulador de apoptose Bcl-2), Bcl-xL no retículo endoplasmático ou a proteína pró-apoptótica Bim nos microtúbulos.

Após o recrutamento de membrana com regiões ricas em PI3P, o complexo Atg5/Atg12/Atg16L se liga e será assim um dos complexos responsáveis pela conjugação de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3. Para tanto, essas conjugações são promovidas por enzimas do sistema ubiquitina-símile (E1, E2, E3). A Atg7 e Atg 10 (tipo E1 e E2, respectivamente) conjugam Atg12 e Atg5 (Ohsumi et al., 2001). Atg5-12 interage com Atg16 presente na membrana do fagóforo durante a etapa de iniciação (ou pré-autofagossomo). Em paralelo, a LC3 [proteína de cadeia leve 3 - e outras proteínas da família Atg8, como GABARAP 1 e 2 (proteína associada ao receptor gama-aminobutírico)] é processada pela cisteíno-protease Atg4 formando a LC3-I (isoforma citosólica da LC3), e por sistemas tipo ubiquitina Atg7 e 3, Atg5-12 (tipo E1, E2 e E3, respectivamente) que possibilitam a ligação ao na região carboxi-terminal do fagossomofosfolipídio PE na membrana do autofagossomo (LC3-II). Esta ligação é transitória, já que a Atg4 é capaz de delipidar PE, e sujeita à regulação por ROS (Scherz-Shouval et al., 2007; Sakoh-Nakatogawa et al., 2013). Durante a formação do autofagossomo, o complexo Atg5-12-16 se dissocia da membrana,



enquanto LC3-PE continua por diferentes etapas da via, desde o alongamento da membrana até após a fusão com o lisossomo, presente tanto na membrana externa como interna do autofagossomo (Figura 1.5C) (Kabeya et al., 2000).

Anterior à fusão com o lisossomo, pode ocorrer também a fusão de autofagossomos aos endossomos tardios e corpos multivesiculares. A degradação dos componentes internalizados ocorre nos lisossomos, organelas com pH entre 4,0-6,0, com presença de enzimas hidrolíticas e proteínas de transporte de aminoácidos, ácidos graxos e outras resultantes da degradação de nutrientes (revisto em Eskelinen, 2009).

Inicialmente, o processo de autofagia foi considerado não-seletivo, por degradar conteúdos próximos ao fagóforo, sem especificidade. Sabe-se, no entanto, que muitos componentes são selecionados para a via autofágica como proteínas, organelas ou até mesmo patógenos. Algumas proteínas, denominadas adaptadoras, realizam ligação da membrana autofagossomal com o conteúdo direcionado para a autofagia. Dentre estas, destacam-se: (i) a p62/SQSTM1 (sequestrossomo 1), que é capaz de associar-se a Atg8, podendo, quando acumulada erroneamente gerar agregados proteicos característicos de algumas doenças neurodegenerativas; (ii) a Parkina e Nix, proteínas que se ligam a Atg8 para recrutar mitocôndria; (iii) ALFY (proteína autofágica ligada a FYVE - quatro proteínas com domínio de dedos de zinco ricos em cisteína), que interage diretamente a Atg5 e se liga a agregados proteicos (revisto em Weidberg et al., 2011).

### 2.1.3.1. mTORC1 e a rapamicina

A rapamicina (também conhecida como sirolimus) é obtida da bactéria de solo da Ilha de Páscoa (Rapa Nui) *Streptomyces hygroscopicus*, e é bastante usada como um antibiótico após transplantes, principalmente na profilaxia da rejeição de transplante renal (Vézina et al., 1975; Sehgal et al., 1975; revisto em Sehgal, 2003).

Sua ação no complexo mTORC1 ocorre pela ligação a proteína FKBP12 que inibe a atividade quinase de mTORC1 (revisto em Ballou & Lin, 2008). Uma das sinalizações mediadas por este complexo envolve o ciclo celular, no qual já foi demonstrado o arraste do ciclo na fase G1 para células tumorais (revisto em Sehgal 2003). Além disso, uma das associações da rapamicina é como agente imunossupressor, por regular a proliferação e diferenciação de linfócitos (revisto em Dummont & Su, 1995). Esta regulação pode acontecer por diferentes vias, destacando tanto a inibição de IL-2 para proliferação de linfócitos T, ou ainda por inibir a ativação leucocitária modulando negativamente o fluxo de cálcio, tanto no sistema imune como em células musculares (Kaftan et al., 1996). No timo, esta modulação pelo fármaco diminuiu o percentual da população duplo positiva (DP), aumentando o número de células CD4+ e CD8+ (Tian et al., 2004). Já no baço, por exemplo, a rapamicina reduz a esplenomegalia em condições de hipertensão portal (Chen et al., 2016).

Como uma das inibições de mTORC1 induz a autofagia e diferentes grupos mostraram a semelhança de resposta a situações de estresse nutricional ou restrição calórica *in vitro* e *in vivo*, estudos utilizando a rapamicina, não apenas como

imunossupressor sugerem seu papel no envelhecimento, promovendo longevidade (Harrison et al., 2009; Anisimov et al., 2011; Komarova et al., 2012; Bitto et al., 2016). Tais estudos sugerem que a promoção da autofagia nas células, associada aos efeitos imunossupressores e antitumorais, levaria ao menor envelhecimento dos organismos, e o aumento do fluxo autofágico, detectado pela maior expressão de LC3-II (Zhang et al., 2013).

## **2.2. Autofagia em cardiopatias**

Assim como em outros tecidos, a homeostase cardíaca depende da autofagia. Junto à proteólise, o mecanismo complementa a degradação de componentes tóxicos, auxilia no controle de qualidade proteico e seu desbalanço pode ocorrer tanto em condições fisiológicas como em patologias (revisto em Terman & Brunk, 2005). Uma das situações interessantes está na formação das junções do tipo gap, dependentes de conexina 43, que, uma vez ubiquitinadas, são direcionadas para a via autofágica, desestabilizando em células sob estresse nutricional (Bejarano et al., 2012).

A depleção de genes Atg5 e 7 já foi demonstrada no órgão, modificando a estrutura sarcomérica, desalinhamento e agregação de mitocôndrias, acúmulo de proteínas ubiquitinadas que contribuem assim para a disfunção contrátil e hipertrofia cardíaca em diversos modelos (Nakai et al., 2007). É descrita a participação da autofagia no crescimento e desenvolvimento de cardiomiócitos, na degradação de colágeno e remodelamento tecidual, na regulação da secreção de células endoteliais (revisto em Lavandro et al., 2015).

A primeira patologia associada foi a cardiomiopatia dilatada, demonstrada em humanos, com o aumento de vacúolos autofágicos (Shiomomura et al., 2001). Em situações de isquemia, onde suprimento energético e de oxigênio é limitado, a autofagia é benéfica, remodelando as células para evitar a morte através da ativação de AMPK, confirmado pela inibição da via induzindo apoptose. Contudo, acompanhado da isquemia, a reperfusão ainda não tem uma definição quanto à participação autofágica, pois os níveis de autofagia podem ser exacerbados sem necessidade e a depleção de beclina-1 mostrou reduzir o dano (Huang et al., 2010; Han et al., 2014).

Durante a hipertrofia cardíaca, estudos sugerem que um nível basal de autofagia é necessário, contudo a aumento do fluxo de autofagia está associado a um aumento da hipertrofia ventricular no modelo de constrição transversal da aorta. A modulação da autofagia por histonas deacetilases (HDACs), sirtuínas e miRNAs apresentam-se como formas de tratamento da patologia em modelos murinos inicialmente (revisto em Lavandero et al., 2015). Na cardiopatia diabética, o fluxo do processo autofágico está inibido no modelo de diabetes tipo I, que também é reduzido quando depletado beclina-1 ou Atg16, enquanto no modelo de diabetes do tipo II, a autofagia age como resposta compensatória a resistência à insulina, fornecendo nutrientes (Mellor et al., 2011; Xu et al., 2013). No envelhecimento do coração, os níveis de beclina-1, Atg5, a razão entre LC3-II/LC3-I estão em decaimento e níveis de p62 aumentados. A indução por rapamicina, no entanto, reduz o envelhecimento e as disfunções nos níveis de cálcio e contratilidade celular (Hua et al., 2011).

O uso de diversos medicamentos ao tratamento de doenças cardiovasculares como as estatinas, losartana, amiodarona, propranolol, verapamil, metformina e análogos da rapamicina utilizam da via, seja para indução ou seu bloqueio com o intuito de melhorar as condições patológicas estabelecidas. A amiodarona, por exemplo, auxilia na degradação de proteínas mal enoveladas, o verapamil induz autofagia inibindo injúria vascular e a sinvastatina induz mitofagia (autofagia de mitocôndrias) para proteção cardiovascular (Zhang et al., 2007; Andres et al., 2013; revisto em Shiatarella & Hill, 2015).

### **2.3. Autofagia no sistema imune**

Como mencionado anteriormente, a autofagia participa de diferentes processos celulares, não apenas degradando material e fornecendo energia, mas também com suas proteínas participando em outras vias celulares. No sistema imune, a participação é relatada seja pela via autofágica em si ou pela participação de diferentes proteínas Atg na inflamação, resposta imune inata e adquirida. A importância da autofagia inicia na diferenciação das células hematopoiéticas em leucócitos, onde a diferenciação, renovação e quiescência celular podem ter a participação da autofagia, demonstrado pelo aumento de expressão de LC3-II e Atg5, enquanto a manutenção de células-tronco indiferenciadas é dependente de Atg7 (Mortensen et al., 2011; Salemi et al., 2012).

Para a sobrevivência e proliferação de linfócitos T e células linfoides inatas, foi observada a participação de Atg5 e Atg7, importantes para a sua maturação (Pua

et al., 2007,2009; O'Sullivan et al., 2016). Ademais, a autofagia de células do epitélio tímico auxilia na seleção de repertório de células T, incluindo a tolerância de antígenos próprios (Nedjic et al., 2008; Kasai et al., 2009; revisto em Bronietzki et al., 2015). Com a relação à seleção tímica, parece que a autofagia influencia na sobrevivência e proliferação de células CD4-CD8<sup>-</sup> e sua transição para duplo positivo, pois quando os genes Atg5 ou 7 foram deletados inicialmente no desenvolvimento tímico, havia poucos linfócitos no órgão (revisto em Botbol et al., 2016).

A participação da autofagia não está restrita aos órgãos linfoides, pois também se observa que em locais de resposta, os leucócitos são modulados de diferentes maneiras. No intestino, por exemplo, a deleção de Atg 16L modifica a ativação de linfócitos T CD4, aumentando o perfil Th2 e reduzindo a população Treg (Kabat et al., 2016). A ativação da célula T depende da sinalização por TCR e moléculas co-estimulatórias, já tendo sido demonstrado que a inibição de mTOR por rapamicina diminui a atividade efetora dos linfócitos e ainda pode induzir anergia, associando a regulação positiva de proteínas Atg. Além disso, a manutenção da atividade de células T auxiliares (Th) é dependente de beclina-1. O funcionamento é mediado também pela ativação de receptores de IL-2 e outras citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$ , que, por sua vez, aumentam os níveis de macroautofagia (Kovacs et al., 2012).

Em células T CD8 de memória e Treg, a incapacidade de realizar a autofagia modifica o metabolismo glicolítico dessas células. Células T CD4 utilizam da AMC para aumentar capacidade responsiva, tanto em linfócitos *naive* como efetores (Valdor et al., 2014; revisto em Botbol et al., 2016).

Com relação aos monócitos, a autofagia parece influenciar na sobrevivência e diferenciação dos monócitos em macrófagos, em um mecanismo de controle de vias bcl-2/beclina-1 (Zhang et al., 2012). A ativação por ROS leva a um aumento de expressão de beclina-1 e a mudanças ultraestruturais em macrófagos, como o aparecimento de diversos autofagossomos circundados por retículo endoplasmático (Perrotta et al., 2011). Ao receberem estímulos como patógenos e/ou macromoléculas, a atividade autofágica é capaz de controlar a sobrevivência de macrófagos, preservando sua função inflamatória, sendo observado que a perda de Atg7 regulando negativamente receptores de superfície como MHC I e II, CD14 e receptores de manose (Stranks et al., 2014).

Os macrófagos também apresentam associação da atividade autofágica com a sinalização de receptores e, conseqüentemente, sua ativação fagocítica. O estímulo com lipolissacarídeo (LPS) ativa TLR4 que induz autofagia em macrófagos murinos. A produção de citocinas também está relacionada, pois citocinas Th1 como IFN- $\gamma$  induzem e citocinas de perfil Th2 como IL-4 e IL-13 reduzem o mecanismo, sugerindo que a autofagia atua como mecanismo mediador de resposta Th1, geralmente proinflamatório e microbicida (revisto em Deretic & Levine, 2009).

### *2.3.1. Autofagia e fagocitose*

A autofagia e a fagocitose são processos intimamente relacionados entre si, que apresentam como direcionamento final o lisossomo, sendo o primeiro relacionado ao englobamento de partículas extracelulares, como patógenos ou restos celulares.

Dentre as semelhanças, ambos processos podem ser regulados por PRRs, apresentam membrana delimitando conteúdo e atuam na captura e degradação de microrganismos (revisto em Deretic & Levine, 2009). A inter-relação entre as duas vias já foi demonstrada, sendo detectados fagossomos enriquecidos de LC3-II por análises proteômicas, enquanto o englobamento de partículas de látex internalizadas é reduzido quando há indução de autofagia. A depleção de Atg7 parece induzir o aumento de receptores de internalização como receptor de macrófago com estrutura de colágeno (MARCO) e receptor “scavenger” de macrófago 1 (MSR1), sendo o aumento desses receptores associado ao acúmulo de p62/SQSTM1 (Shui et al., 2008; Lima et al., 2011; Bonilla et al., 2013).

A convergência funcional dessas vias é demonstrada pela fagocitose associada a LC3 (LAP, do inglês “LC3-associated phagocytosis”), que consiste no englobamento de partículas extracelulares associadas ao recrutamento de moléculas da maquinaria autofágica, que promovem a maturação do fagossomo, facilitando a degradação pelo lisossomo (Sanjuan et al., 2007; revisto em Martinez et al., 2013). Não é considerado macroautofagia, pois não há o recrutamento do complexo de iniciação ULK1 e FIP200, porém requer diversas moléculas da via autofágica como Atg5 e Atg7, Vps34, Atg 16L, beclina-1. Uma diferença expressiva é a membrana única envolvendo o material, ao contrário da autofagia (Sanjuan et al., 2009). Além disso, há a participação de moléculas como a NOX2 (NADPH oxidase 2) e a Rubicon, proteína que realiza a inibição de autofagia (revisto em Green et al., 2016). Rubicon promove a associação do complexo PI3K a membrana fagossomal com LC3 e



também é responsável pela estabilização do complexo NOX2, junto ao PI3P, levando a produção de ROS (Martinez et al., 2015).

Até o momento, os estudos envolvendo LAP foram demonstrados com o recrutamento de TLRs, como em infecções por *Aspergillus fumigatus*, *Salmonella typhimurium*, *Burkholderia pseudomallei*, *Leishmania major-anexina*<sup>+</sup>, células entóticas e mortas, partículas de Zymosan (Sanjuan et al., 2007; Martinez et al., 2011, 2015; Crauwels et al., 2015; Franco et al., 2017; revisto em Lai & Devenish, 2012).

### 2.3.2. Autofagia nas infecções

Um dos principais e mais estudados papéis da autofagia no sistema imune envolve a defesa celular, ao eliminar patógenos, direta ou indiretamente. Isso está relacionado à convergência da via com endocitose, o aumento da atividade microbicida na eliminação de estruturas estranhas à célula e a apresentação antigênica (revisto em Deretic & Levine, 2009).

Nas infecções por microrganismos intra- e extracelulares, a autofagia atua na degradação de componentes via lisossomal. Não obstante, os patógenos apresentam diversas formas de subverter a autofagia. A partir de diferentes estudos foram observados mecanismos onde a autofagia mostra-se essencial para a célula eliminar o agente estranho ou ainda para este microrganismo sobreviver no hospedeiro.

#### 2.3.2.1. Xenofagia

A xenofagia é a eliminação de patógenos mediante a participação da via autofágica. Este processo foi descrito na infecção *in vitro* por diversos patógenos de

importância médica, como *Salmonella enterica*, *Mycobacterium tuberculosis*, grupo A de *Streptococcus* e alguns protozoários como *Toxoplasma gondii* (Gutierrez et al., 2004; revisto em Deretic & Levine, 2009). A eliminação de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* (BCG) foi associada ao aumento da expressão de beclina-1 e LC3, além da participação de IFN- $\gamma$  na indução. Quando ocorria a incubação com rapamicina ou estresse nutricional, a degradação dos patógenos era maior (Gutierrez et al., 2004; revisto em Colombo, 2006).

Diferentes mecanismos foram selecionados para os patógenos sobreviverem à autofagia da célula hospedeira. O citomegalovírus humano, previne a via autofágica por indução de mTOR, enquanto herpes vírus bloqueia beclina-1. Há ainda a inibição da maturação do autofagossomo, observada em infecções por rotavírus, *Coxiella burnetti*, *Legionella pneumophila* e *Listeria monocytogenes*; o bloqueio do reconhecimento do patógeno pela via autofágica em *Shigella flexneri*; a utilização da autofagia para replicação, sobrevivência intracelular ou liberação de produtos, como realizam a *Listeria monocytogenes*, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Clamídia* sp e alguns protozoários (revisto em Deretic & Levine, 2009).

#### 2.3.2.2. Autofagia nas infecções por protozoários

A eliminação ou sobrevivência de diversos protozoários na célula hospedeira está associada à via autofágica. Dos grupos de relevância médica, destacam-se os estudos em três protozoários: *T. gondii*, *Leishmania* spp e *T. cruzi* (revisto em Duque et al., 2013).

A fusão do VP de *T. gondii* em macrófagos ativados por CD40 parece ser dependente da maquinaria autofágica, pois a depleção de Atg5 e a inibição farmacológica por 3-metiladenina (3-MA) mostram redução na infecção. Por outro lado, em fibroblastos infectados pelo coccídeo, a autofagia é exacerbada pelo contato e, se induzida farmacologicamente ou por estresse, aumenta o aporte de nutrientes para o patógeno (Andrade et al., 2006; Wang et al., 2009; Zhao et al., 2009).

Em *Leishmania*, a participação autofágica também é controversa, dependendo do tipo celular, linhagem de camundongo e espécie de protozoário. Em *L. amazonensis*, há a participação de autofagia *in vitro* e *in vivo*, além da indução de processo por IFN- $\gamma$ , rapamicina ou estresse nutricional elevar a carga parasitária em macrófagos de camundongo BALB/c, contudo não há alteração para macrófagos murinos de C57BL/6 ou para infecções com *L. major* (Pinheiro et al., 2009; Cyrino et al., 2012). Para *L. donovani*, foi observado que macrófagos de pacientes infectados aumentam o processo autofágico em resposta à infecção, confirmados pela superexpressão de alguns microRNAs e da expressão de beclina-1 e Atg 3 em macrófagos humanos de linhagem (Mitroulis et al., 2009; Singh et al., 2016). Para *L. major*, parece que a exposição de fosfatidilserina na superfície do parasito induz a associação a vesículas contendo LC3, paralelo à ativação autofágica para induzir resposta imune por linfócitos T CD4 e diminuindo a sobrevivência intracelular (Crauwels et al., 2015), além da internalização estar associada a receptores TLRs (Franco et al., 2017).

No caso de *T. cruzi*, Romano e colaboradores (2009) indicaram que o parasito induz a autofagia em células de ovário de hamster chinês (CHO), associando a

molécula de LC3 ao VP e quando o mecanismo era exacerbado, seja por rapamicina ou estresse nutricional, ocorria um aumento da infecção e na proliferação de amastigotas (Romano et al., 2009; revisto em Romano et al., 2012). Entretanto, trabalhos posteriores contrapõe esta hipótese, já que em situações de indução autofágica, não há alteração de infecção e/ou carga parasitária em macrófagos BALB/c ou ainda uma redução na quantidade de parasitos por célula infectada em HeLa (Pinheiro et al., 2009; Maeda et al., 2011; Martins et al., 2011). Mais recentemente, em estudo realizado com células de tecido epitelial conectivo de fibrosarcoma (HT1080) durante a infecção pelo protozoário, foi observado que a indução de autofagia na célula hospedeira não implica na fusão do autolisossomo ao VP e que não há a degradação da proteína carreadora p62 (Onizuka et al., 2017).

No modelo de infecção *in vivo* por *T. cruzi* em camundongos, foi observada a indução autofágica na infecção aguda no tecido hepático. Neste estudo, associa-se o aumento de ácidos graxos da alimentação ao controle da infecção por redução do processo autofágico mediante indução de ROS (Lizardo et al., 2017).

Ressalta-se ainda que os próprios parasitos também podem ter a autofagia induzida em diferentes condições. No caso do *T. cruzi*, inicialmente foi observado que o tratamento com compostos tripanocidas como naftoquinonas, naftoimidazóis, posoconazol, sirtuínas e também a amiodarona induziam a autofagia em formas do protozoário, culminando na morte celular, tanto autofágica como conversão com via apoptótica e necrótica (Braga et al., 2005; Santa-Rita et al., 2005; Menna-Barreto et al., 2007, 2009; Fernandes et al., 2012; Veiga-Santos et al., 2012, 2014; Fonseca-Berzal, et al., 2016; Lazarin-Bidóia et al., 2016). Mais que isso, a autofagia neste

protozoário pode ocorrer com alterações metabólicas como as que acontecem na diferenciação, na qual se observa mudanças no ambiente do hospedeiro que promovem a transformação da forma epimastigota em tripomastigota metacíclica ou tripomastigota em amastigota (revisto em Alvarez et al., 2008a). Na metaciclogênese, há a participação das proteínas Atg4 e isoforma de Atg8 e mais recentemente foram caracterizadas nesse modelo, as proteínas de endereçamento vacuolar TcVPS15 e TcVPS34, participantes do complexo PI3K (Alvarez et al., 2008b, Schoijet et al., 2017).

### 3. Justificativa

A autofagia mostra-se como um mecanismo essencial para a sobrevivência dos mais diversos tipos celulares e tecidos, uma vez que é uma via de degradação de componentes atuando na homeostase e como processo alternativo para a eliminação de patógenos. Estudos anteriores sugerem a participação da via autofágica como um possível modo de manutenção do ciclo do *T. cruzi* em células hospedeiras (Romano et al., 2009; Martins et al., 2011; Onizuka et al., 2017). Apesar disso, não há um consenso se este é um processo que beneficia a célula hospedeira ou o protozoário. Além, células cardíacas e macrófagos, dois tipos celulares alvos do parasito, ainda não apresentam estudos corroborando a participação da autofagia na interação com o parasito. A compreensão *in vitro* da associação da via autofágica com processos celulares pertinentes à infecção permitirá inferir se há a possibilidade dessa via também atuar na infecção experimental *in vivo*, mecanismo ainda desconhecido até o momento. Estudos *in vivo* de diferentes cardiopatias suportam a hipótese de

participação da via autofágica como via protetora ou maléfica, dependendo do tipo celular envolvido e do desenvolvimento da patologia (Cavallini et al., 2008; Mattson et al., 2016; Pietrocola et al., 2017). Acreditamos que a modulação da autofagia participe na miocardite chagásica aguda, representando um importante passo na patogênese e progressão da doença.

## II. OBJETIVOS

### 1. Objetivo geral:

Avaliar a participação da via autofágica nas células do hospedeiro durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo*.

### 2. Objetivos específicos:

- Avaliar a autofagia de células hospedeiras (fagocíticas e não fagocíticas) durante a infecção pelo *T. cruzi* (cepa Y) *in vitro*;
- Correlacionar da via autofágica e fagocitose de células na infecção *in vitro*;
- Investigar a autofagia durante a infecção experimental no modelo murino agudo da doença de Chagas (tratamento ou não com rapamicina) avaliando parâmetros parasitológicos, eletrocardiográficos, bioquímicos bem como sua associação com a resposta imune do hospedeiro.

### III. Material e métodos

#### 1. Ensaio *in vitro*

##### 1.1. Cultura de células

###### 1.1.1. Células primárias

Camundongos *Swiss* foram usados para obtenção de macrófagos peritoneais (MΦ) e células cardíacas embrionárias (CC). Os macrófagos peritoneais foram obtidos por lavado peritoneal, ressuspensão das células em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Waltham, EUA), quantificadas e plaqueadas ( $3 \times 10^5$  em lâminulas de 12 mm ou  $1 \times 10^6$  em placa de Petri 35 mm) por 1h a 37°C, em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> para adesão. As células foram submetidas a lavagens com tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2), e mantidas em meio DMEM contendo 10% soro fetal bovino (SFB) (LGC, São Paulo, Brasil), 4mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), 1000U/ml penicilina e 50µg/mL estreptomicina (HyClone, Logan, EUA) por 24h em estufa a 37°C, em 5% CO<sub>2</sub> (Araújo-Jorge et al., 1989).

As CC foram obtidas de ventrículos de corações de embriões (18°-21° dia) de camundongos *Swiss*, submetidos à dissociação mecânica e enzimática em PBS suplementado com 0,05% tripsina (Sigma-Aldrich) e 0,01% colagenase tipo 2 (Worthington, Lakewood, EUA) a 37°C. Após a obtenção, as células foram plaqueadas por 10 min para adesão de fibroblastos e posteriormente replaqueadas ( $1,5 \times 10^5$  em lâminulas de 12 mm ou  $1 \times 10^6$  em placa de Petri 35 mm) e mantidas a 37°C por 24h na estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> em meio DMEM suplementado com 10% SFB, 1mM



CaCl<sub>2</sub>, 1mM L-glutamina, 2% extrato de embrião de pinto, 1000U/mL penicilina e 50µg/mL estreptomicina (Meirelles et al., 1986).

### 1.1.2. Células de linhagem

As células de fibroblasto embrionário murino (MEF), transfectadas com LC3-GFP, gentilmente cedidas pelo Dr. Leonardo Travassos, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub> em meio DMEM contendo 10% SFB, 1000U/ml penicilina e 50µg/mL estreptomicina. Para os ensaios, as células foram dissociadas mecanicamente com auxílio de raspador e plaqueadas (1,0x10<sup>5</sup> em lamínulas de 12 mm ou 1x10<sup>6</sup> em placa de Petri 35 mm). Foram também cedidas células MEF LC3-GFP nocaute para ATG5 (ATG 5<sup>-/-</sup>), cedidas também pelo Dr. Leonardo Travassos.

### 1.2. Parasitos

Foram usadas as formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, obtidos por punção cardíaca de camundongos *Swiss*, no pico da parasitemia (7° dia pós-infecção), conforme procedimento de rotina do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz-RJ, Oliveira, 2008). Para alguns ensaios, tripomastigotas da mesma cepa foram obtidos de células cardíacas ou células Vero (ATCC® CCL-81, linhagem de epitélio renal de macaco verde africano). Para manutenção de formas tripomastigotas obtidas células de cultura foram usadas células Vero mantidas em meio RPMI completo como descrito no item 1.1.1.

### 1.3. Indução de autofagia

#### 1.3.1. Citotoxicidade

Para induzir a autofagia em culturas celulares foram usados o indutor farmacológico rapamicina (Sigma-Aldrich) e o meio DMEM sem glicose (Gibco) e não suplementado com SFB ou L-glutamina (meio de estresse nutricional). A concentração e tempo máximos de incubação dos indutores foram previamente definidos através de ensaios de citotoxicidade em células não infectadas pelo método do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich). Após incubação, foi adicionado 0,5 mg/mL MTT por 4h a 37°C, sendo a reação interrompida pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck). A leitura foi realizada a 490nm no espectrofotômetro Spectramax384 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA) (Menna-Barreto et al., 2009).

#### 1.3.2. Citometria de fluxo

Paralelamente, os tripomastigotas também foram incubados com meio de estresse nutricional e rapamicina com as concentrações e tempos definidos pelo ensaio de citotoxicidade em célula de mamífero para verificar sua viabilidade. Os parasitos foram marcados com 50nM TMRE (etil ester perclorato de tetrametilrodamina) e 0,1µM TO-PRO-3 (Invitrogen, Waltham, EUA) por 15 min. Foram usados como controle positivo 10µM FCCP (carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona) (Sigma-Aldrich) ou 0,5% saponina (Sigma-Aldrich). As amostras foram

mantidas em gelo até a aquisição no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, New Jersey, EUA) e analisadas pelo *software* Dako Summit 4.3 (Dako, Glostrup, Dinamarca). 10000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida considerando morfologia típica do parasito controle (recém obtido). Alterações na fluorescência do TMRE foram quantificadas por mediana da fluorescência (MFI).

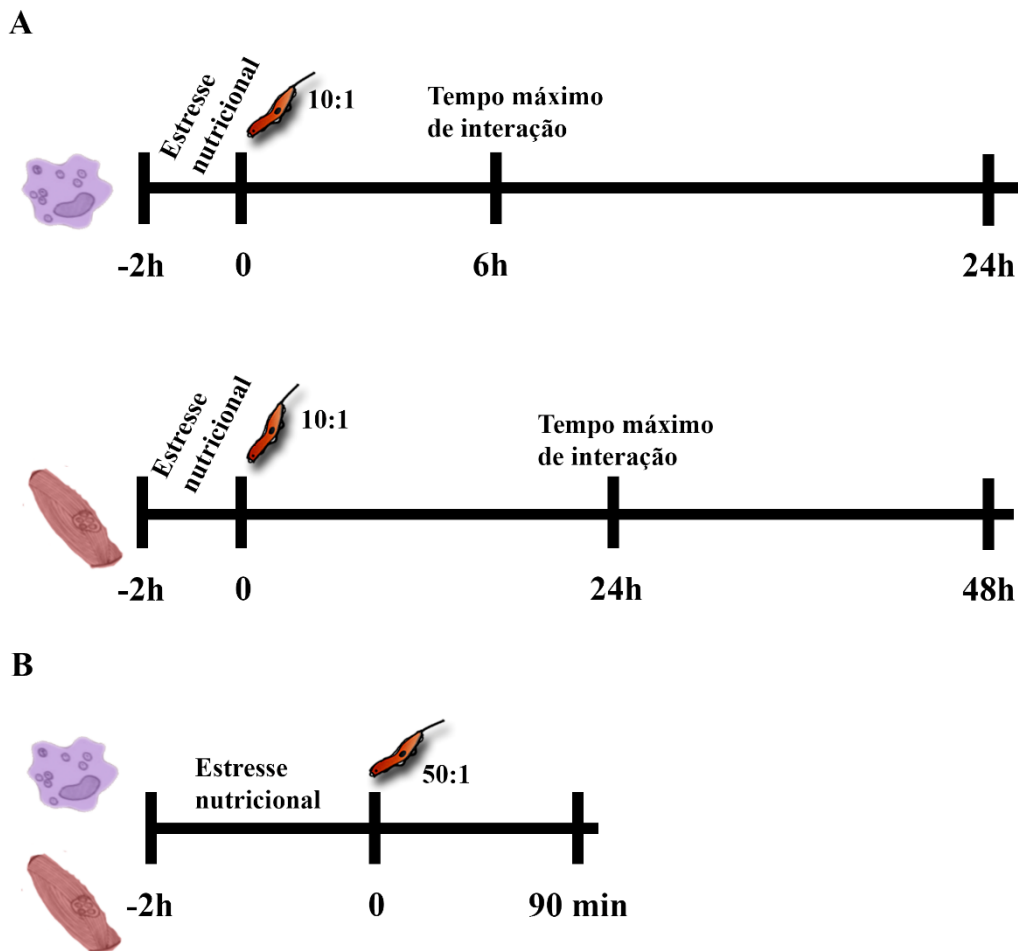
#### 1.4. Interação patógeno-célula hospedeira

MΦ e CC foram infectadas com a razão de 10 tripomastigotas por célula hospedeira. Para interação, foram usados os tempos de 6h e 24h MΦ e CC, respectivamente. Após tais tempos, os parasitos não internalizados foram retirados por lavagem com PBS. Para análise de tempo curto de interação (90 min), a razão de 50 parasitos:1 célula foi usada. Para ensaios de fagocitose, foram utilizados tripomastigotas sanguíneos mortos, aquecidos previamente a 80°C por 20 min em banho-seco para lise dos protozoários. Paralelamente, foram usadas partículas de Zymosan A (Sigma-Aldrich) na razão 10 partículas por célula.

##### *1.4.1. Avaliação da autofagia na infecção por T. cruzi*

Para verificar a importância da autofagia na infecção, a indução de autofagia foi realizada em distintos tempos da interação parasito-célula hospedeira. Para avaliar a internalização, a autofagia foi induzida 2h antes da infecção de MΦ e CC (Gutierrez et al., 2004b; Maruyama et al., 2008), seguido de infecção e mantendo a indução,

como descrito na Figura 3.1. Dois momentos foram avaliados: a indução autofágica prévia, seguida de interação parasito-célula hospedeira e manutenção da infecção até 24h e 48h, para MΦ e CC (Figura 3.1A) e com uma razão maior (MOI 50) por 90 min de interação (Figura 3.1 B).



**Figura 3.1. Desenho experimental da indução de autofagia anterior a infecção nas células hospedeiras em tempos longos (A) e em tempo curto (B).** As células foram submetidas ao estresse nutricional por 2h antes da infecção e mantidas até o final do ensaio. Os parasitos, na razão 10:1 (A) ou 50:1 (B) foram adicionados, e mantidos até o primeiro tempo de análise.

Para avaliar a influência da autofagia na manutenção da infecção e proliferação do parasito na célula, a indução do estresse foi realizada após a infecção (Figura 3.2). MΦ e CC foram infectados por 6h e 24h, respectivamente, e: (i) foram submetidos à indução de autofagia até 24h (MΦ) e 48h (CC) (Figura 3.2A) ou (ii) mantidos em meio suplementado até diferenciação em amastigota (24h ou 48h para MΦ e CC) e submetidos por 24h a indução de autofagia, completando 48h (MΦ) e 72h (CC) de infecção (Figura 3.2B).

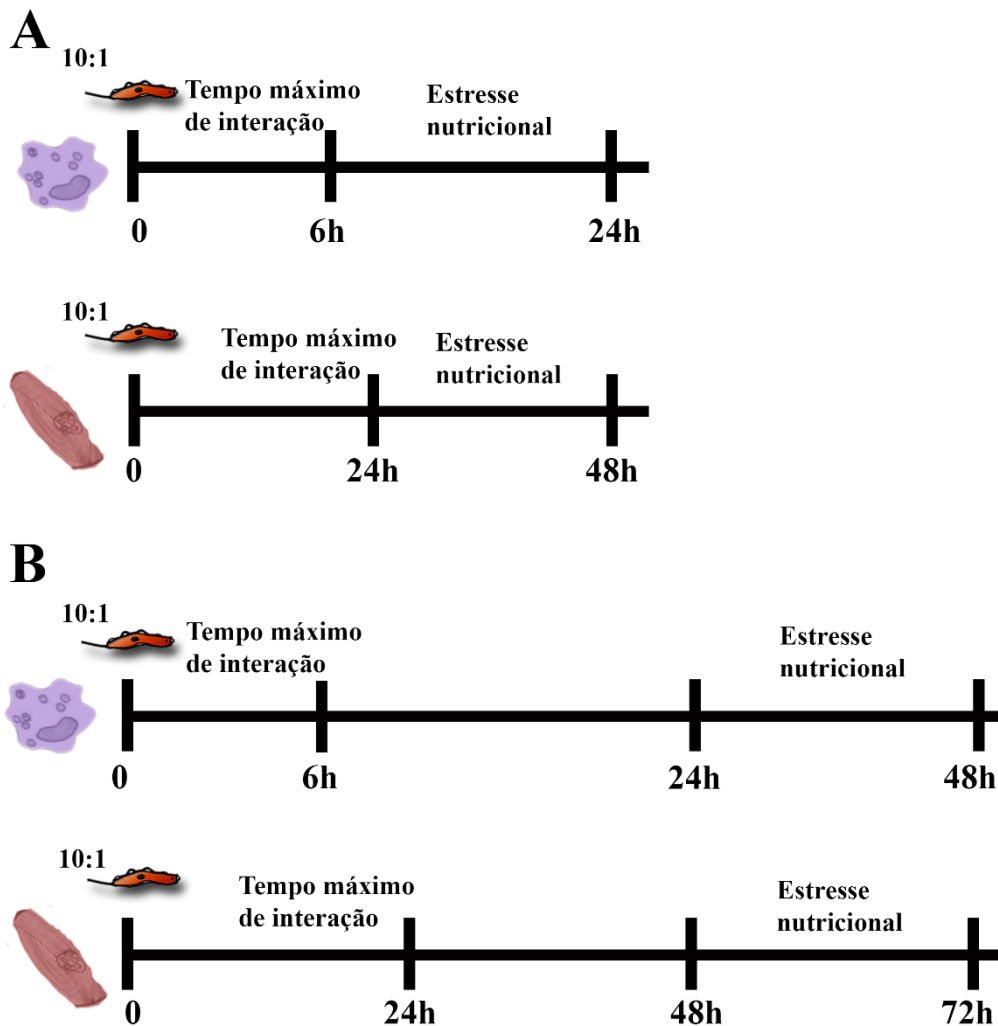


Figura 3.2. Desenho experimental da indução de autofagia após a infecção. As células foram infectadas com tripomastigotas na razão 10:1 e submetidas ao estresse nutricional após diferenciação do parasito

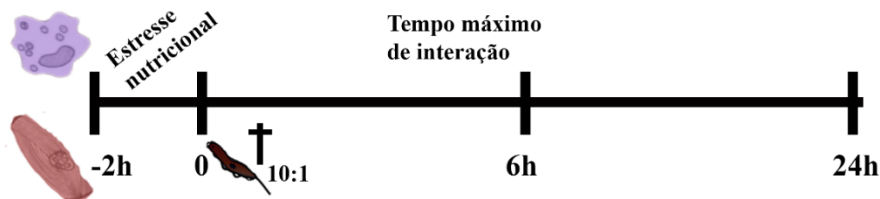
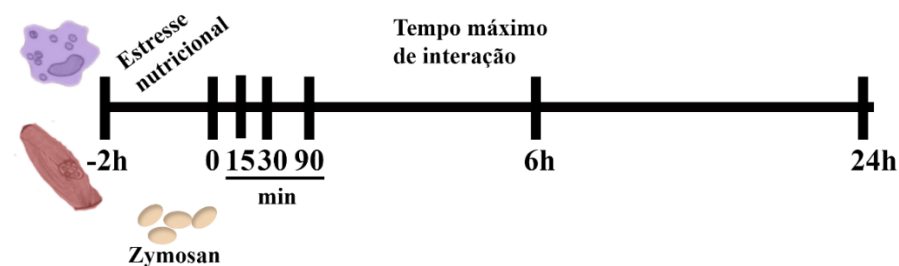
(A) ou após a proliferação de amastigotas (B), mantendo o tempo máximo de interação de 6h (MΦ) e 24h (CC).

Após os diferentes tempos de infecção, as células foram lavadas 3 vezes em PBS, fixadas em metanol, coradas com panótico rápido (Laborclin, Pinhais, Brasil) e quantificadas (300 células por lamínula) em microscópio de campo claro Zeiss AxioLab A1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) utilizando os parâmetros percentual de células infectadas e parasito por célula infectada.

#### *1.4.2. Avaliação da autofagia na fagocitose*

Para avaliar a importância da autofagia na fagocitose, as células foram pré-incubadas com indutores de autofagia ou meio completo, e incubadas com parasitos mortos, por choque térmico, ou partículas de Zymosan na razão de 10 partículas por célula hospedeira. Foram analisados os tempos de interação até 24h para MΦ e CC como descrito na Figura 3.3.

Após os diferentes tempos, as células foram fixadas, coradas com panótico rápido e quantificadas em microscópio de campo claro (300 células por lamínula) analisando os parâmetros: percentual de células com partículas ou parasitos mortos internalizados e partículas ou parasito por célula internalizada.

**A****B**

**Figura 3.3. Desenho experimental da indução de autofagia anterior a fagocitose de parasitos mortos (A) ou partículas de Zymosan (B).** Células foram submetidas ao estresse nutricional por 2h e mantidas sob tais condições durante interação com tripomastigotas mortos (A) ou partículas de Zymosan (B) por diferentes tempos, até 24h.

### 1.5. Imunofluorescência

Para a análise da presença da proteína LC3 (marcador de autofagossomos), as células foram lavadas em PBS e fixadas a temperatura ambiente por 20 min em solução de paraformaldeído a 4%. Após lavagens em PBS, as células foram permeabilizadas e bloqueadas por 1h, sob agitação a 4°C, em solução de bloqueio [PBS contendo de 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 0,1% Tween 80 (Amresco, Solon, EUA), 2% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich), 5% SFB, 10% soro de carneiro]. Após lavagem em tampão contendo as mesmas concentrações de Tween 80 e Triton X-100, as células foram incubadas por 1h com anticorpo primário contra LC3B produzido em coelho (Sigma-Aldrich, concentração final - 0,5 µg/mL,

número de catálogo L8793). Após mais lavagens, as lamínulas foram incubadas por 1h com anticorpo secundário contra coelho produzido em cabra acoplado ao fluorocromo Alexa Fluor 488 (Invitrogen, concentração final - 1,3 µg/mL). A marcação do núcleo das células (e dos parasitos, assim como cinetoplasto) foi feita utilizando 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, concentração final - 0,2 µg/mL). Todas as lâminas foram montadas em meio de montagem octano do diazabicyclo 1.4 [2.2.2] (DABCO, Sigma-Aldrich) e analisadas no microscópio de fluorescência Zeiss AxioObserver A1 (Zeiss), com sobreposição de imagens. Nesses ensaios foram quantificados (200 células/ lamínula): o percentual de células LC3-positivas e a quantidade de pontos de LC3 por célula. Como controle para ligações inespecíficas, o anticorpo primário foi omitido e acrescentado o anticorpo secundário.

## 2. Ensaio *in vivo*

### 2.1. Modelo murino e infecção

Camundongos *Swiss* machos com 4 semanas (peso aproximado de 20-25g) foram usados nos ensaios. Os animais foram mantidos em caixas com no máximo de seis animais, acondicionados no setor de experimentação animal do LBC/LITEB (IOC/Fiocruz), em ciclos de 12h de presença/ausência de luz por cinco dias antes do início da infecção. Os camundongos foram inoculados, inicialmente, com  $10^3$  ou  $10^4$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, obtidas por punção cardíaca no pico da parasitemia como descrito no item 1.2. Semanalmente, os animais foram pesados, sangue por punção caudal coletados e eletrocardiograma realizado.



## 2.2. Tratamento com rapamicina

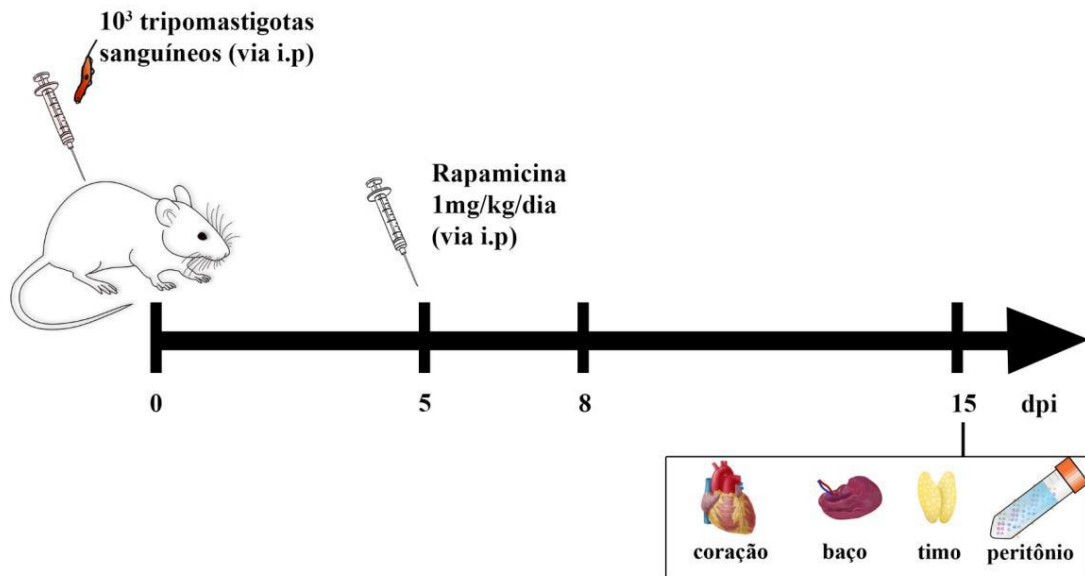
Para o tratamento *in vivo* com rapamicina (LC Laboratories, Woburn, MA, EUA), o composto foi diluído em DMSO na concentração de 2 mg/mL e, para obtenção da concentração de tratamento, a solução era diluída em PBS. A concentração final de DMSO inoculada não ultrapassava 1% (Kimball et al., 2000). Para estabelecimento da concentração do tratamento com rapamicina, os camundongos foram tratados com 200µL via intraperitoneal por nove dias com 0,5-2mg/kg/dia. Foram avaliados peso, mortalidade, parâmetros bioquímicos de toxicidade hepática, renal e dano cardíaco, eletrocardiográficos e histopatológicos.

Após o estabelecimento da concentração de uso da rapamicina, animais infectados foram tratados a partir do 5º dia pós infecção (dpi5). Na figura 3.4 está descrito o desenho experimental de infecção associado ao tratamento com rapamicina.

## 2.3. Parasitemia e mortalidade

A partir do dpi 5, os animais tiveram a parasitemia acompanhada diariamente, assim como a mortalidade. Os animais infectados tiveram 5µL sangue coletados pela cauda diariamente para acompanhamento da parasitemia. Foi utilizado o método Pizzi-Brenner (Brenner 1962), contando 50 campos em objetiva de 40x no microscópio

Elipse 200 (Nikon, Tóquio, Japão). A mortalidade e sobrevivência dos animais foi avaliada diariamente.



**Figura 3.4.** Desenho experimental do ensaio de infecção associado ao tratamento com rapamicina. Os camundongos foram infectados com  $10^3$  tripomastigotas e a partir do 5º dia iniciou-se o tratamento com rapamicina (1 mg/kg/dia). Os animais foram eutanasiados e coletados coração, baço, timo e lavado do peritônio.

#### 2.4. Dosagem bioquímica

Nos dias 0, 8 e 15 de infecção, todos os animais tiveram sangue coletado pela cauda ou por punção cardíaca, adicionando heparina para obtenção do plasma. O plasma foi usado para análise dos seguintes parâmetros bioquímicos: AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanino aminotransferase), ureia, creatinina e CK-MB (creatina quinase isoenzima MB) (Doles, Goiânia, Brasil). Todas as dosagens foram realizadas seguindo o protocolo do fabricante, com modificações de volume

(ajustados para 200 $\mu$ L) em placa de 96 poços *UV-Star* (Greiner Bio One, Kremsmünster, Austria). A leitura colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro M3 Molecular Devices (Molecular Devices) nos comprimentos de onda determinado pelo fabricante dos kits.

## 2.5. Eletrocardiograma

Para a avaliação de parâmetros eletrocardiográficos, os camundongos foram avaliados sem sedação usando transdutores postos abaixo da pele para análise da derivação DII. Os traçados obtidos foram adquiridos com sistema digital PowerLab 2/20 conectado ao bio-amplificador com 2mV por 1 s (PanLab Instruments, Barcelona, Espanha). Os filtros foram normalizados entre 0,1 e 100 Hz e os traçados foram analisados usando o software Scope para Windows v3.6.10 (PanLab Instruments). Foram avaliados os seguintes parâmetros: frequência cardíaca (bpm, batimentos por minuto), alterações eletrocardiográficas e a duração dos intervalos PR, QRS e QT em milissegundos (Campos et al., 2016).

## 2.6. Análises histopatológicas

Os camundongos foram eutanasiados em câmara com CO<sub>2</sub> e o miocárdio foi coletado, lavado em PBS, pesado, o ventrículo incluído em OCT Tissue-Tek (Sakura, EUA) para congelamento em nitrogênio líquido. Foram realizados cortes (5  $\mu$ m de espessura) em criostato CM1850 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). Após

adesão dos cortes às lâminas de vidro, as amostras foram fixadas em 4% PFA, lavadas em PBS e coradas com hematoxilina de Mayer e eosina (HE).

Para avaliação de ninhos e infiltrados inflamatórios (considerados a partir de no mínimo dez células inflamatórias), foi realizada a quantificação representativa de pelo menos dois cortes de tecido coletados de no mínimo três camundongos por grupo, considerando 20 campos por amostra. As imagens usadas para essa análise foram feitas em microscópio AxioLab A1 (Zeiss) usando objetiva de 20x, utilizando o software Axiovision 4.3 (Zeiss). A quantificação de células e ninhos, área ocupada por ninhos de amastigotas e de infiltrados inflamatórios foi realizada com o auxílio dos softwares Image J (NIH, EUA) - com o uso do *pugin* Cell Counter e Cell Profiler (Broad Institute of Harvard and MIT, EUA).

## 2.7. Coleta de células e imunofenotipagem por citometria de fluxo

Para análise das populações linfocítos e macrófagos por citometria de fluxo, foram analisados peritônio, baço, timo e coração. Os ensaios de imunofenotipagem foram realizados com células isoladas de pelo menos 3 animais por grupo. Para análise do peritônio, foi realizado lavado peritoneal com DMEM sem SFB a 4°C. Para o timo e baço, os órgãos foram macerados e colocados em meio DMEM suplementado com SFB a 4°C. No caso do baço, foi realizada a lise osmótica de hemácias por incubação por 10s em tampão hipotônico de PBS em água destilada (1:9).

Os corações dos camundongos foram coletados e os ventrículos cortados em fragmentos de 1 a 2mm e extensivamente lavados em PBS a 4°C para retirada de células do sangue. Após lavagens exaustivas, os fragmentos do miocárdio foram submetidos à dissociação mecânica e enzimática, com o uso de solução 100 U/mL de colagenase tipo IV (277 units/mg, Worthington), diluída em meio DMEM + 3mM de CaCl<sub>2</sub>. Foram realizados 5 ciclos de digestão enzimática sob agitação suave por 15 min a 37°C e a cada ciclo, as células obtidas eram centrifugadas a 1000 rpm (142g) por 10min e imediatamente transferidas para meio DMEM suplementado com 10% de SFB a 4°C. Anterior a marcação fenotípica, amostras foram filtradas em membrana de 40µm (Greiner) para retirada de grumos e fragmentos celulares (Cascabulho et al., 2012).

Todas as células dos órgãos analisados foram incubadas por 20 min em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 10% de soro de carneiro inativado para bloqueio de receptores Fc. Na avaliação de morte celular, as células também foram incubadas com Live/Dead Far Red (ou Violet) fixable dead cell (Invitrogen) 30 min antes da marcação extracelular à temperatura ambiente em PBS. Para marcação de superfície, as células foram incubadas com os anticorpos, previamente titulados: CD3-PE, CD4-APC (ou PE-CF594), CD8-PECy7, F4/80-APC, CD62L – PerCP, CD44-PE e CD127-Alexa Fluor 488 (Biolegend, San Diego, EUA) ou ainda CD3-PE-CF594 e CD4-PE-CF594 (BD Biosciences). Após a incubação por 30 min a 4°C, as células foram lavadas em DMEM + 10% SFB e fixadas e permeabilizadas em solução fixadora e permeabilizadora Cytofix/Cytoperm (BD, San Jose, EUA). Foi realizada a incubação por 30 min com anticorpo contra LC3 produzido em coelho (Sigma-Aldrich,

concentração final - 0,5 µg/mL, L8793), seguida de lavagens para retirada do anticorpo e nova incubação por 30 min com anticorpo secundário contra coelho produzido em cabra conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor 488 (Invitrogen, concentração final - 1,3 µg/mL). As incubações foram realizadas com  $2 \times 10^4$  células dispostas em placas de 96 poços em formato U no volume final de 20 µL.

As amostras foram mantidas a 4°C até a leitura, quando foram resuspensas em PBS para aquisição em citômetro de fluxo FACS Aria (BD Biosciences). Foram adquiridos 10000 eventos dentro da região de morfologia compatível aos diferentes tipos celulares, com exclusão de *debris* e agregados. Na análise dos dados, que foi feita utilizando o software FlowJo 10 (LLC, Ashland, EUA).

## 2.8. Ensaio de bloqueio de autofagia *ex vivo*

Para avaliação da dinâmica de LC3 em células inflamatórias, realizamos o bloqueio de autofagia com adição de leupeptina seguindo Pietrocola e colaboradores (2017). Resumidamente, as células de baço, timo e peritônio, (coletadas como descrito no item anterior), foram plaqueadas com  $1 \times 10^5$  células por poço na placa de 96 poços com 2mM de leupeptina (Sigma). Após 2h, as células foram marcadas como descrito no item 2.7 para avaliação de fenotipagem, LC3 e morte celular.

## 2.9. Imunofluorescência

As lâminas com os cortes de coração foram fixadas em 4% PFA, lavada em PBS e submetidas a incubação com solução de permeabilização e bloqueio (descrito no item 3.1.6. Imunofluorescência) por 1h em câmara úmida. Os cortes foram posteriormente incubados com o anticorpo primário contra LC3B produzido em coelho (Sigma-Aldrich, concentração final - 0,5 µg/mL) em câmara úmida *overnight* e seguido de lavagens com tampão de bloqueio e incubação com anticorpo contra coelho produzido em cabra acoplado ao fluorocromo Alexa Fluor 488 ou 635 (Invitrogen, concentração final - 1,3 µg/mL). Para contracoloração dos cortes, foi usado Azul de Evans (50µg/mL) e a marcação de ácidos nucleicos foi realizada com DAPI (Sigma-Aldrich, concentração final - 0,2 µg/mL). As análises foram realizadas no microscópio de fluorescência AxioObserver A1 (Zeiss). Para representação qualitativa foram adquiridas imagens também no microscópio onde foram analisadas a marcação de LC3B em 20 campos, avaliando a localização predominante dos pontos nas diferentes regiões do tecido cardíaco.

## 3. Análise estatística

Para os ensaios *in vitro*, todos os dados numéricos obtidos estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para duas amostras independentes não-paramétricas, realizados no mínimo três experimentos independentes, com nível de significância considerado de  $p \leq 0.05$ . Para os ensaios *in vivo*, diferentes testes estatísticos foram aplicados. Os dados

numéricos obtidos estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão ou gráficos representativos (parasitemia e curva de mortalidade). Para parasitemia, comparação do número de ninhos de amastigotas, o teste t de Mann-Whitney foi utilizado para duas amostras independentes não-paramétricas, com nível de significância considerado de  $p \leq 0.05$ . Para análise de mortalidade, foi usada a curva de sobrevivência, pelo método Kaplan-Meier, usando o teste estatístico log-rank de Mantel-Cox. Para comparação entre mais amostras, foram usados o teste 2-way ANOVA associado ao pós-teste Bonferroni. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA).

#### 4. Aspectos éticos

Todos os ensaios envolvendo o uso de animais foram realizados em conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Conselho Nacional de Experimentação Animal - COBEA (<http://www.cobea.org.br/>) e com a Lei Federal 11.794 (8 de outubro de 2008). Os procedimentos seguiram as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da FIOCRUZ e os animais usados foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) e Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/ Unicamp) (L- 005/2017).

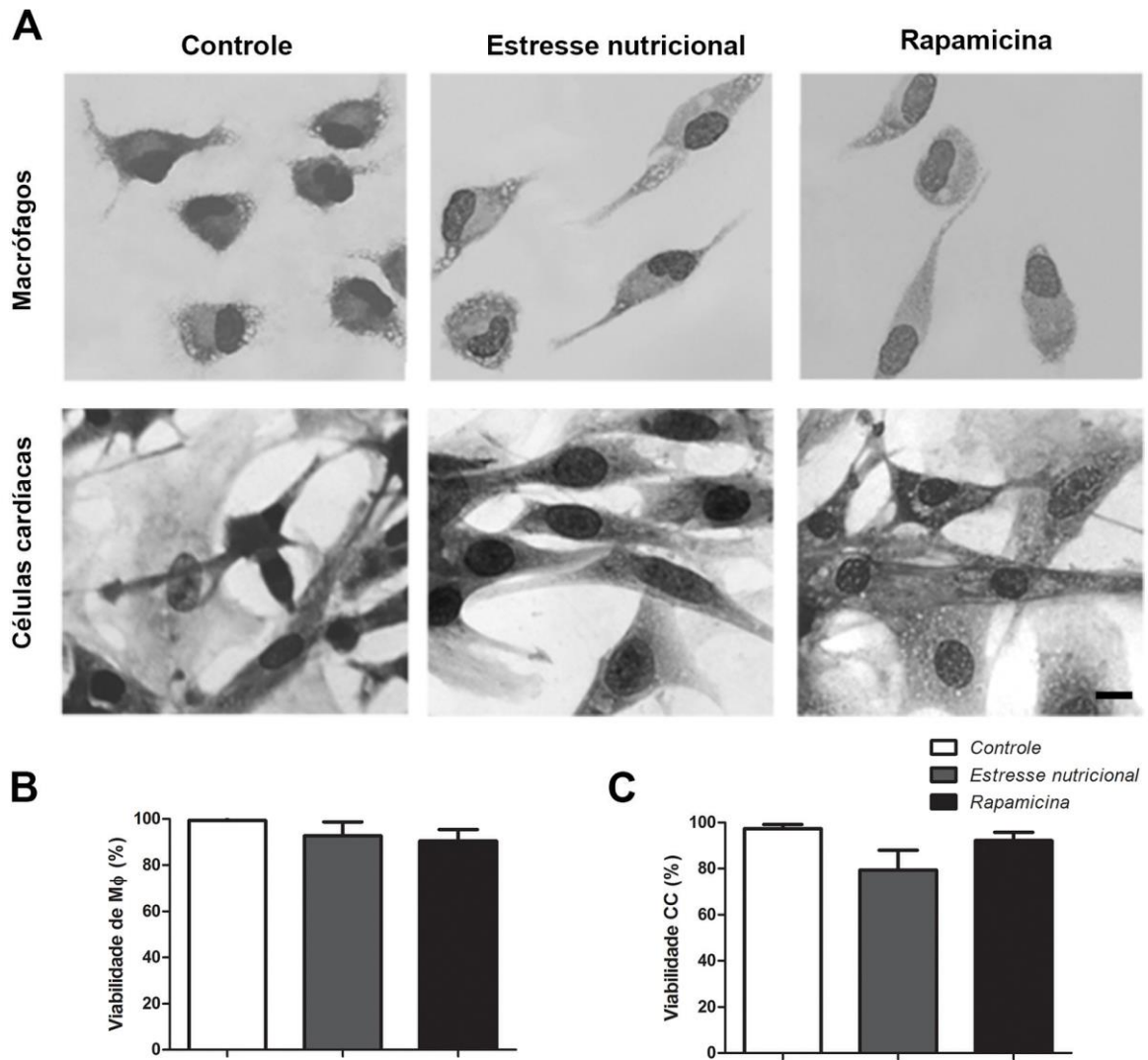


## IV. RESULTADOS

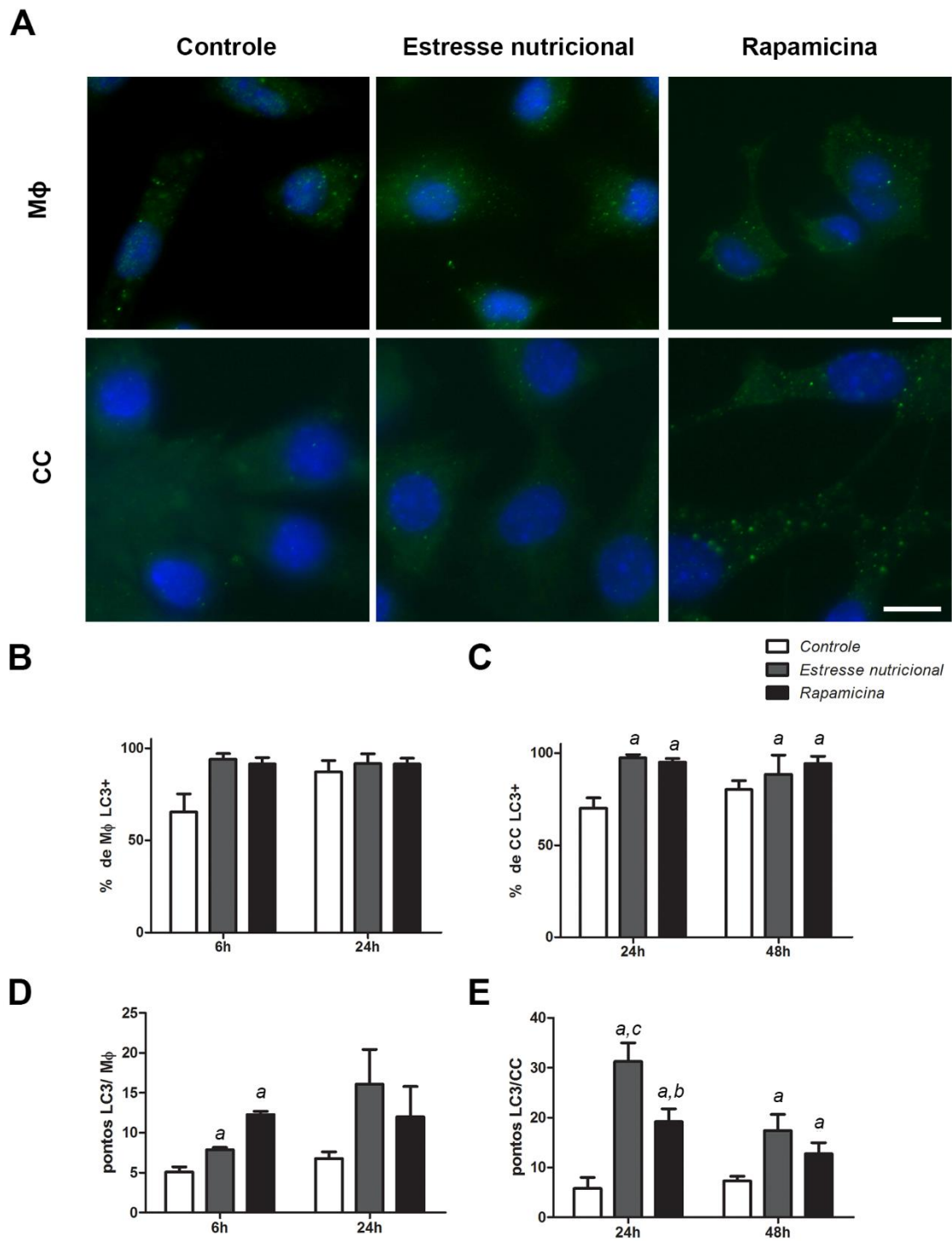
### 1. *In vitro*

#### 1.1. Efeito direto da indução autofágica na viabilidade das células hospedeiras e do *T. cruzi*

Realizamos o ensaio de MTT por até 48h com diferentes concentrações de rapamicina e com o meio de estresse nutricional para avaliar a viabilidade de M $\phi$  e CC submetidas as condições de indução autofágica (Figura 4.1). Para ambos tipos celulares, a concentração máxima testada de 22  $\mu$ M rapamicina e o meio de estresse nutricional não foram tóxicos, sem diferenças significativas em relação ao controle (Figuras 4.1A-C). Verificamos, em seguida, se nos tempos e tipos celulares utilizados, a autofagia seria induzida pelos mesmos estímulos, e foi feita avaliação de LC3-II (forma conjugada a PE), marcador clássico de autofagia, por imunofluorescência (Figura 4.2A). A incubação de CC com rapamicina e meio de estresse nutricional nos dois tempos avaliados, levaram ao aumento no percentual de células positivas para LC3, enquanto o percentual de M $\phi$  LC3+ é semelhante em 24h com ou sem indução autofágica (Figuras 4.2B, C). Em relação ao parâmetro quantidade de marcação por pontos LC3 por célula, um número maior foi observado em M $\phi$  e CC controle, principalmente nos tempos iniciais avaliados (Figuras 4.2D, E). Já em CC, o estresse nutricional aumentou até 5,4x o número de pontos de LC3 em relação ao controle. Aumento semelhante (até 3,3x) foi observado após o tratamento com a rapamicina (Figura 4.2E).

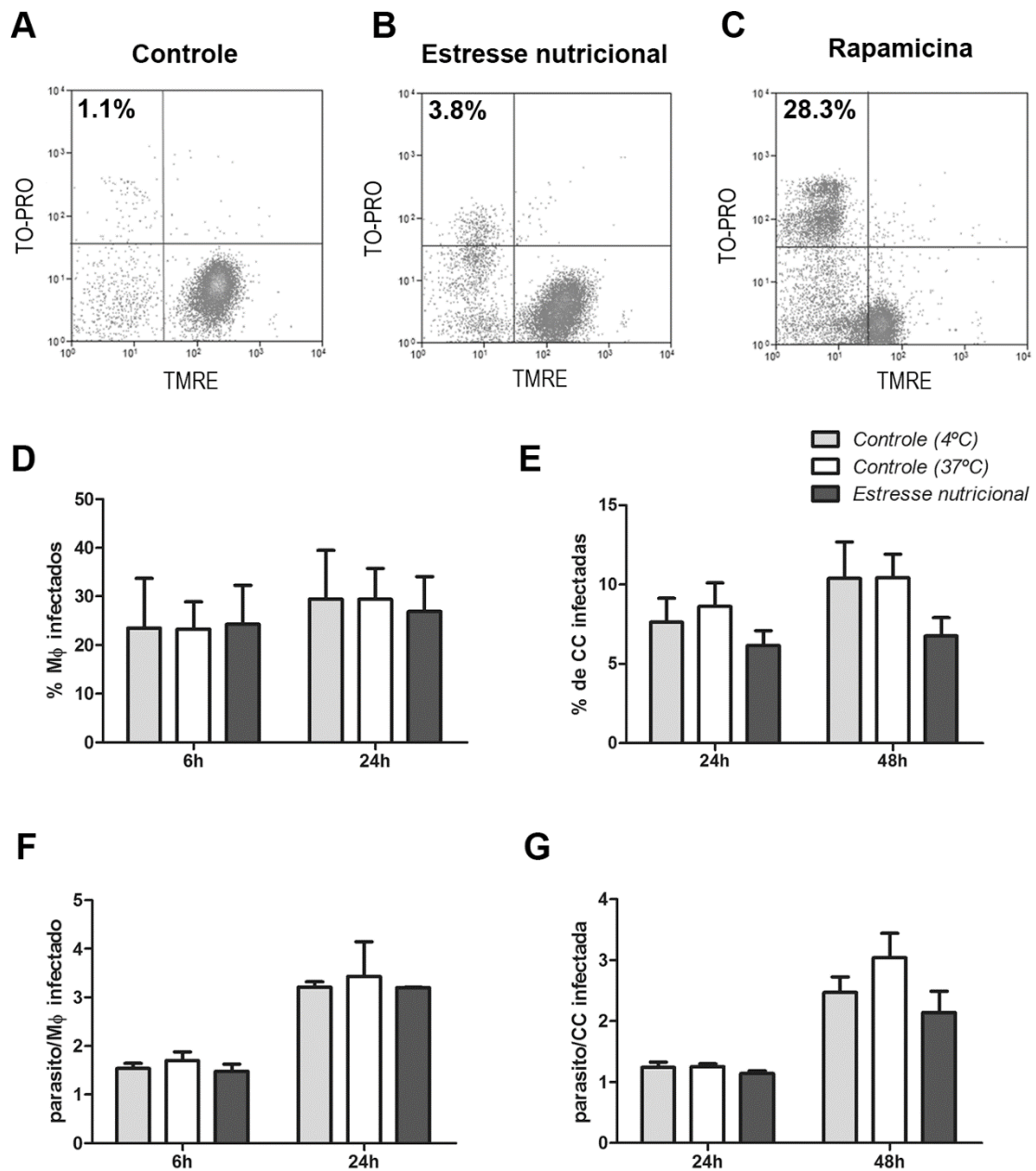


**Figura 4.1. A indução autofágica não compromete a viabilidade de Mφ e CC.** (A) Painel representativo de Mφ e CC corados com panótico rápido. Barra: 10μm. (B, C) Percentual de viabilidade celular avaliado por ensaio colorimétrico de MTT de (B) Mφ e (C) CC submetidos a indução autofágica (rapamicina e meio de estresse nutricional) após 24 e 48h, respectivamente (n:3, com duplicata biológica).



**Figura 4.2. Incubação com estresse nutricional e rapamicina promove autofagia em M $\phi$  e CC.** (A) Painel representativo com M $\phi$  (24h, superior) e CC (48h, inferior), submetidos ao estresse nutricional ou rapamicina. Marcação de LC3 em verde e ácidos nucleicos em azul - DAPI. Barras: 10 $\mu$ m. (B, C) Percentual de M $\phi$  (B) e CC (C) LC3-positivas; (D, E) número de pontos LC3 por célula (n=4; <sup>a,b</sup> p<0,05, *One-way* Anova, Bonferroni *post test*).

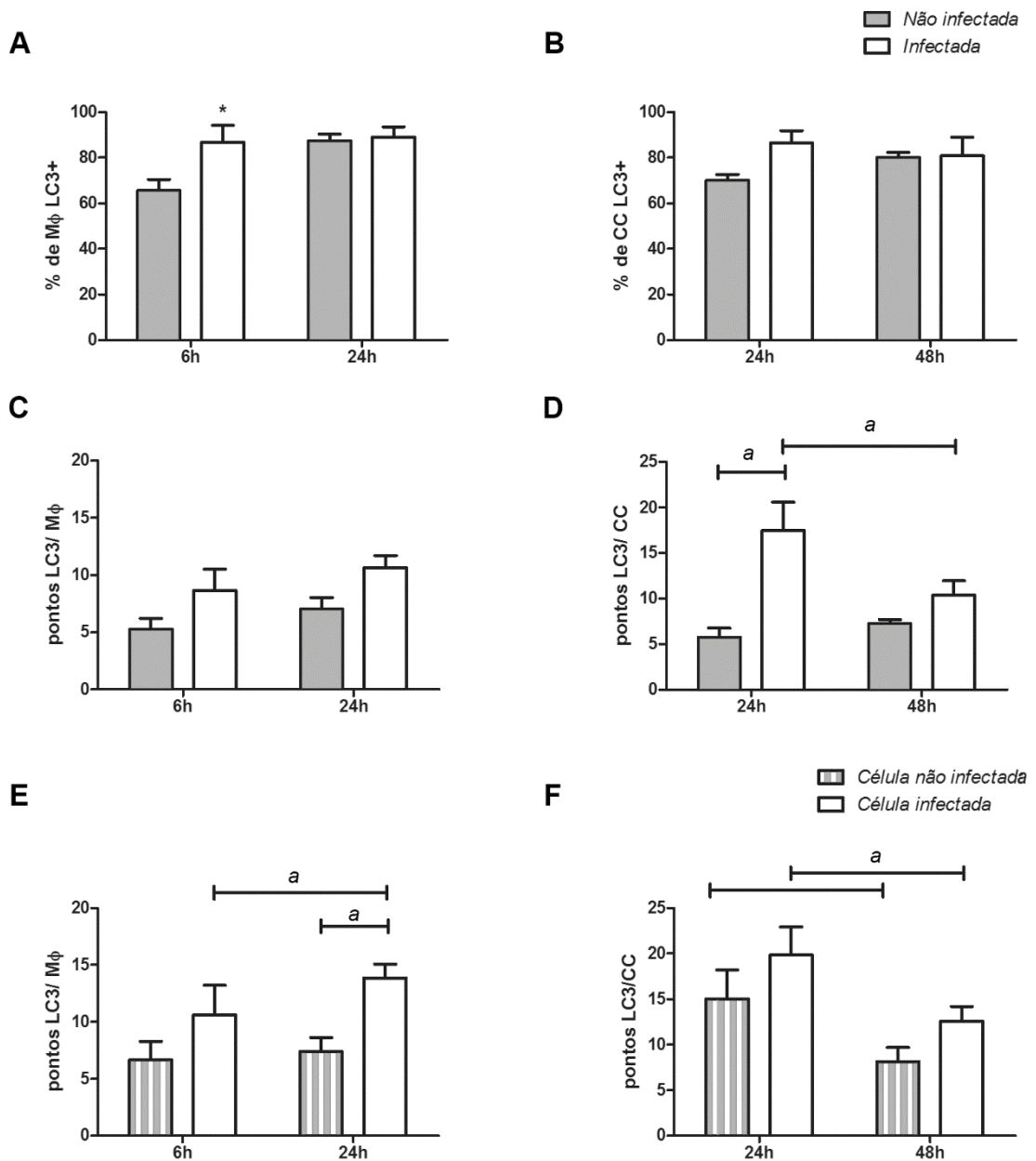
Em paralelo, foi feita a toxicidade da indução autofágica para o *T. cruzi*. A análise foi realizada após delimitar a morfologia dos parasitos em FSC x SSC (em escala logarítmica para aquisição). A incubação das formas tripomastigotas com rapamicina acarretou uma redução no potencial de membrana mitocondrial (marcação com TMRE) bem como na viabilidade dos parasitos após incubação por 24h (Figuras 4.2 A-C). Os parasitos submetidos a incubação com o meio de estresse nutricional não sofreram alterações significativas nos tempos analisados quanto a viabilidade (Figura 4.3B). A redução da intensidade de marcação por TMRE (MFI controle: 209,7; rapamicina: 44,4) e o aumento do percentual de eventos TO-PRO<sup>+</sup> (quase 28% a mais que no controle) em tripomastigotas tratados com rapamicina, apontam uma perda da integridade de membrana plasmática (Figura 4.3C). A queda do potencial de membrana mitocondrial de tripomastigotas sob estresse nutricional, contudo, não alterou a sua infectividade, mostrando percentual de infecção e número de parasito/célula hospedeira semelhante aos parasitos controle (em RPMI suplementado e parasitos mantidos a 4°C) (Figuras 4.2D, E). Desta forma, o tratamento com rapamicina foi excluído dos ensaios subsequentes, sendo apenas utilizado o meio de estresse nutricional como indutor de autofagia.



**Figura 4.3. Viabilidade dos parasitos após estímulos autofágicos.** (A-C) Painéis representativos do gráfico de pontos de parasitos marcados com TMRE e TO-PRO nos grupos controle (não-tratados), incubados com meio de estresse nutricional e 22 $\mu$ M de rapamicina (direita) por 24h. Os valores nos gráficos de pontos indicam o percentual de eventos TO-PRO SP. (D, E) Percentual de (D) M $\phi$  e (E) CC infectados e (F, G) parasito/célula hospedeira após incubação do parasito sob estresse nutricional (24h). Parasitos incubados a 4°C foram usados como controle de temperatura (n=4; <sup>a</sup> p<0,05, *Mann-Whitney t test*).

## 1.2. Avaliação da autofagia durante a infecção por *T. cruzi*

Avaliamos se a infecção modularia a via autofágica através da expressão da proteína LC3-II por imunofluorescência. Para tal, foram estabelecidos dois tempos para M $\phi$  (6h e 24h) e CC (24h e 48h). Em ambos tempos avaliados, a maior parte de M $\phi$  e CC expressaram LC3-I no citoplasma (Figuras 4.4 A, B), sendo que em M $\phi$  da cultura infectada por 6h há um aumento de 20% de células LC3<sup>+</sup>, enquanto em CC não há diferença significativa nos tempos analisados. Não foram observadas diferenças na quantidade de pontos LC3 por célula entre M $\phi$  infectados ou não, entretanto, cultura de CC infectadas apresentaram mais pontos LC3 que a cultura não infectada em 24h, número este que reduziu em 48h (Figuras 4.4 C, D). Vale ressaltar que a maior parte dos pontos LC3 da cultura infectada de M $\phi$  é observado em células nas quais há infecção nos dois tempos analisados. Por outro lado, na cultura infectada de CC não há diferença entre células com ou sem parasitos (Figuras 4.4 E, F). M $\phi$  infectados apresentaram um maior número de pontos de LC3/célula tempo-dependente (1,2x mais pontos em 4h), enquanto em CC ocorre o inverso, reduzindo para a metade a quantidade de pontos/ célula em 48h.



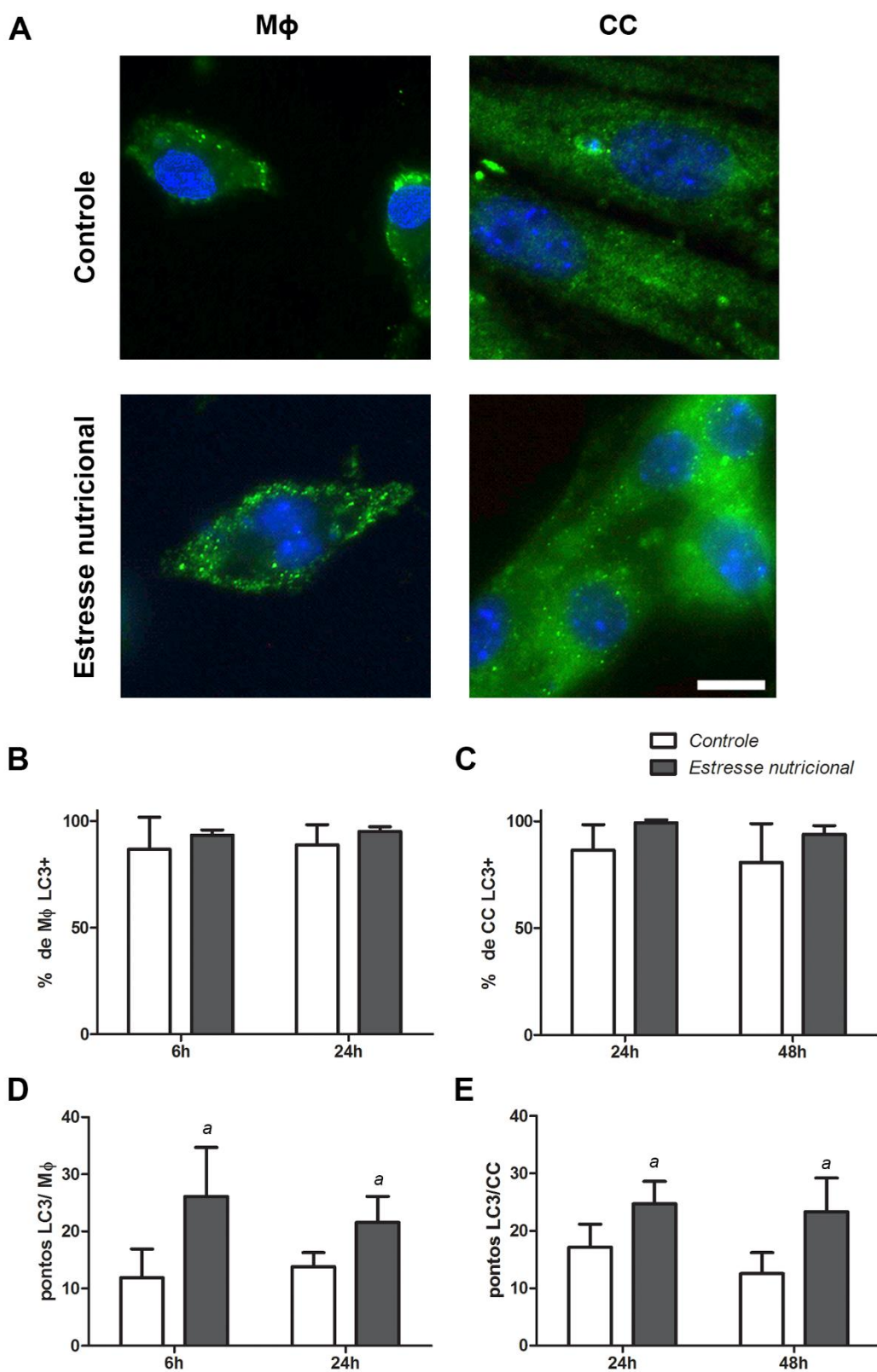
**Figura 4.4. Avaliação da autofagia na cultura infectada e não infectada.** (A, B) Percentual de M $\phi$  (A) e CC (B) LC3-positivas; (C, D) número de pontos de LC3 por célula na cultura não infectada e infectada; (E, F) número de pontos de LC3 por células nas culturas infectadas (n=4; \*p<0,05, *Two-way ANOVA test*, *Bonferroni post test*).

### 1.3. A influência da indução autofágica na infecção por *T. cruzi*

Considerando a análise de viabilidade dos parasitos, ambas as células hospedeiras foram submetidas à incubação por 2h com meio de estresse nutricional, seguida pela adição dos tripomastigotas (Figura 4.5). Observamos que as células sob estresse nutricional apresentaram um aumento de pontos de LC3 por célula em ambos os tempos analisados (Figura 4.5 A), embora este o percentual de células LC3<sup>+</sup> seja em torno de 95% em ambos tipos celulares (Figuras 4.5 B, C). Este aumento no número de pontos de LC3 foi de pelo menos 2x maior que a cultura controle infectada em Mφ (6 e 24h) e em CC (48h) (Figuras 4.5 D, E).

Analisamos o percentual de células infectadas e a razão parasito/célula hospedeira, em células previamente submetidas ao estresse nutricional, seguidas de infecção (Figuras 4.6A-D). Mφ incubados em meio de estresse nutricional apresentaram um decréscimo de 60% na infecção, enquanto em CC a redução foi significativa apenas após 48h de infecção, com queda de 42% quando comparado ao controle (Figuras 4.6 A, B). Além da redução na infecção, Mφ em estresse nutricional apresentaram menos parasitos por célula infectada, fenômeno não detectado em CC (Figuras 4.6 C, D). Alternativamente, encontramos resultados semelhantes quanto as células foram infectadas com tripomastigotas (cepa Y) obtidas da cultura de CC ou células Vero (dados não mostrados).





**Figura 4.5. Participação da autofagia na infecção por *T. cruzi* em culturas submetidas ao estresse nutricional antes da infecção.** (A) Painel representativo com Mφ e CC infectados, submetidos ao estresse nutricional. Marcação de LC3 em verde e ácidos nucleicos da célula hospedeira e do parasito em azul - DAPI. Barra: 10 μm. (B, C) Percentual de Mφ (B) e CC (C) LC3-positivas; (D, E) número de pontos LC3 por célula (n=4; <sup>a</sup>p<0,05, *Mann-Whitney t test*).

A outra condição analisada foi a infecção prévia à indução de autofagia, submetida em dois momentos: logo após a interação da célula hospedeira com o tripomastigota ou após a diferenciação em formas amastigotas e proliferação do parasito (Figura 4.7). Quando a autofagia foi induzida logo após o contato com o parasito, a infecção ou parasitos/célula hospedeira em M $\phi$  não foi reduzida (Figuras 4.7 A, B). Entretanto em CC, nos dois protocolos de indução autofágica, ocorreu uma redução no número de células infectadas, 40 e 23% em 24 e 72h, respectivamente, além da diminuição de 25% do número de parasitos por célula infectada no tempo mais tardio (Figuras 4.7 C, D).

Também foi avaliado ainda se o aumento da razão de parasitos por célula (50:1) em menor tempo de interação (90 min), mudaria o perfil de infecção de ambos tipos celulares com estresse nutricional anterior à interação (Figura 4.8). Em M $\phi$  sob estresse houve uma redução de 50% no número de células infectadas, sem alteração no número de parasitos intracelulares, ao passo que em CC não ocorreu diferença de infecção neste tempo curto.

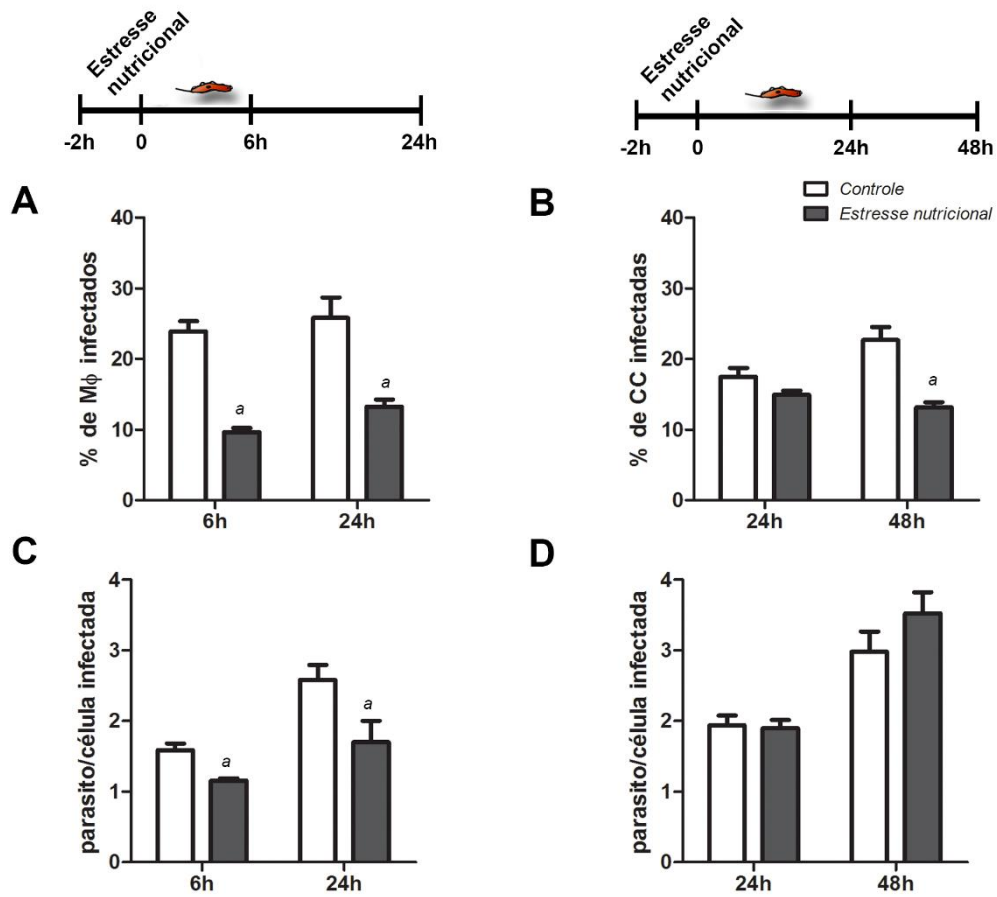
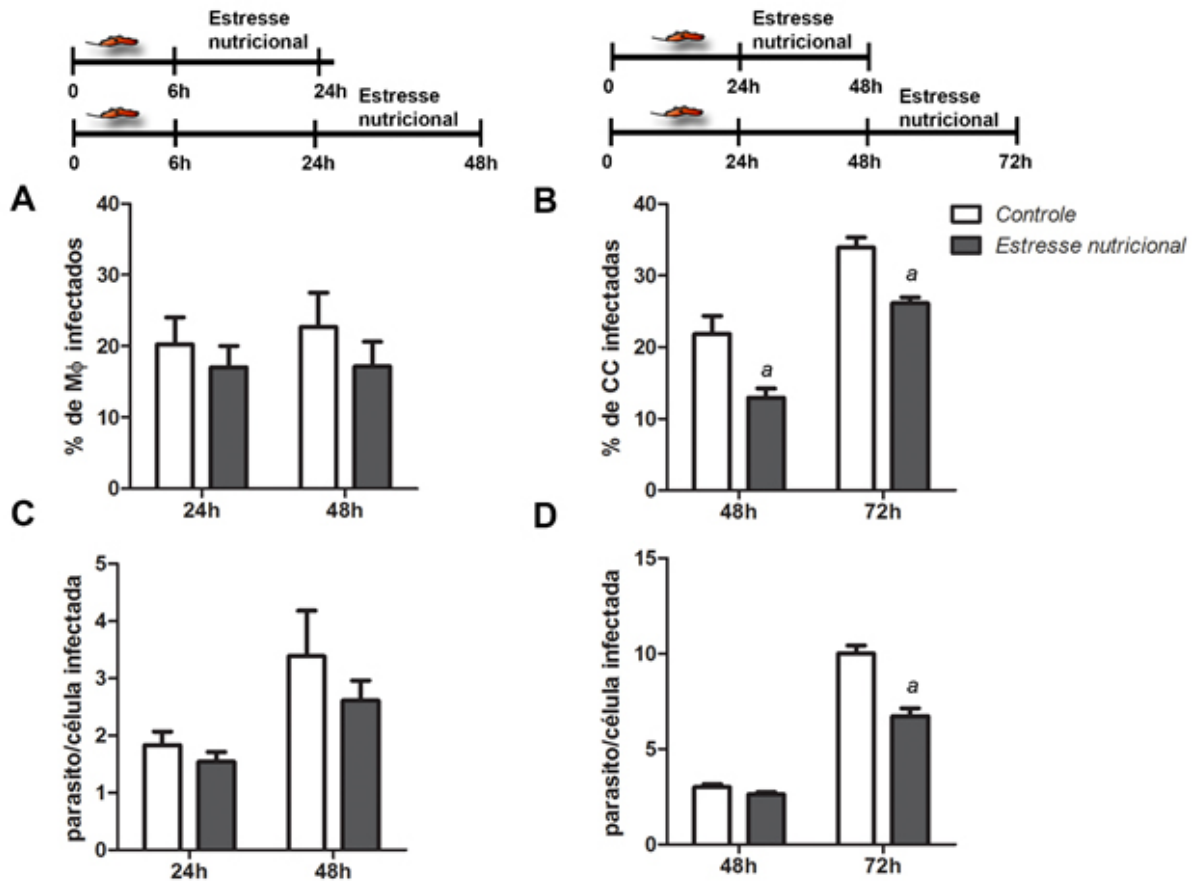


Figura 4.6. Avaliação da infecção por *T. cruzi* associado à indução autofágica antes da interação. Células foram incubadas por 2h antes da infecção e mantidas sob tal condição durante interação. (A, B) Percentual de infecção de Mφ (A) e CC (B) e (C,D) parasito/ célula infectada em células controle (barra branca) ou com meio de estresse nutricional (barra cinza escura) (n=4;  $p < 0,05$ , *Mann-Whitney t test*).



**Figura 4.7. Avaliação da infecção por *T. cruzi* associado à indução autofágica após a interação.** Células foram primeiro incubadas com o parasito e o meio de estresse nutricional adicionado após a interação com o protozoário ou após a diferenciação em amastigota. (A, B) Percentual de infecção de M $\phi$  (A) e CC (B) e (C, D) parasito/ célula infectada em células controle (barra branca) ou com meio de estresse nutricional (barra cinza escura) (n=4; <sup>a</sup>p<0,05, *Mann-Whitney t test*).

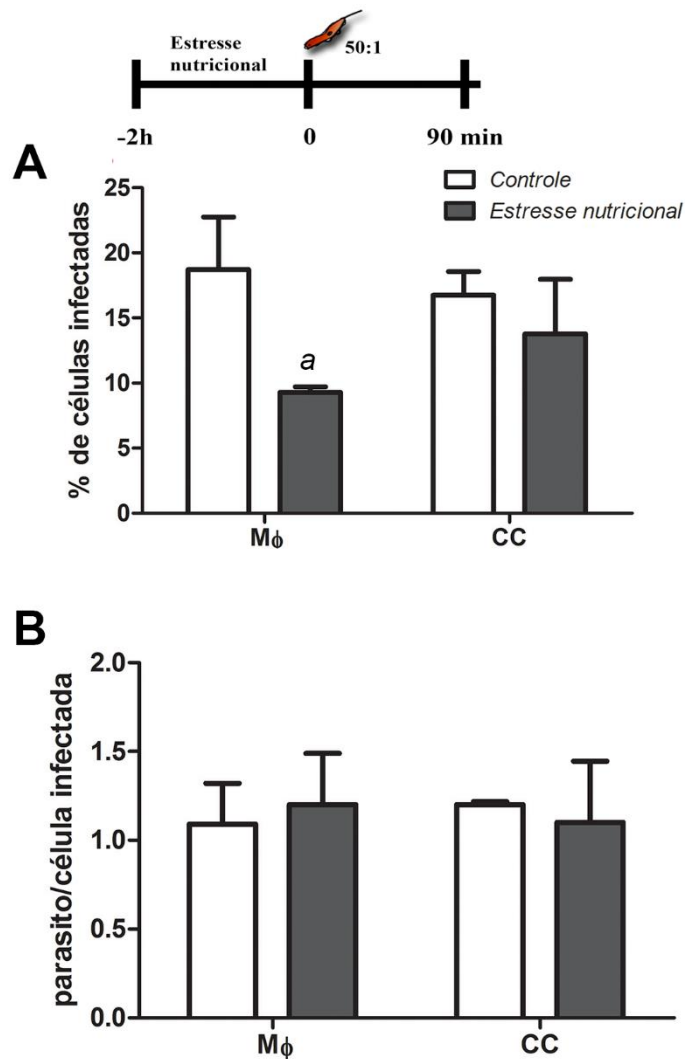
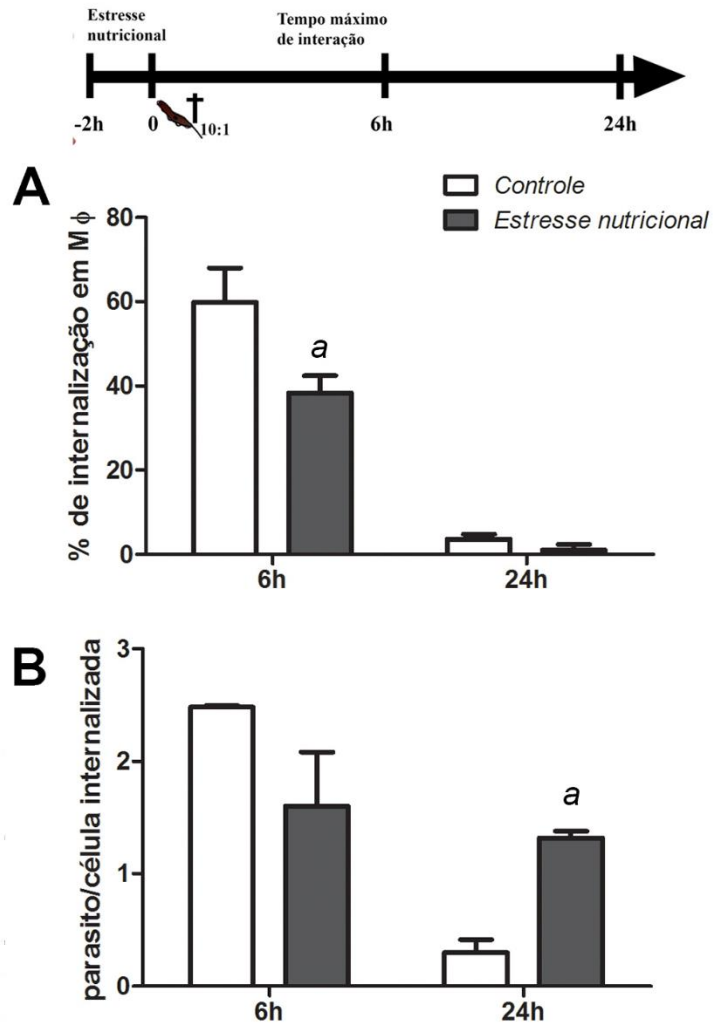


Figura 4.8. Avaliação da infecção por *T. cruzi* com aumento de razão de parasitos por célula em curto tempo de interação (90 min). Células foram submetidas ao estresse nutricional e infectadas na razão 50:1 por 90 min e quantificadas (A) o percentual de infecção de Mφ e CC e (B) parasito/célula infectada no grupo controle (barra branca) ou com meio de estresse nutricional (barra cinza escura (n=3;  $p < 0,05$ , Mann-Whitney *t* test)).

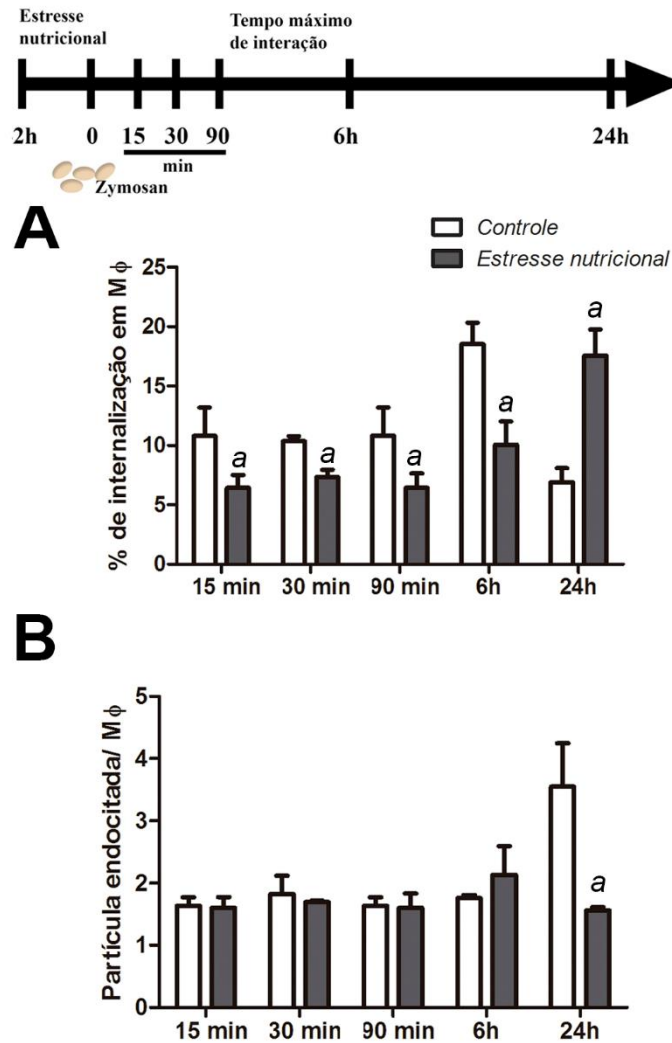
#### 1.4. Avaliação da capacidade fagocítica sob indução de estresse nutricional

Para analisar se a indução de autofagia influenciaria na fagocitose dos dois tipos celulares, submetemos as células ao estresse nutricional e subsequente adição às culturas tripomastigotas mortas ou partículas de Zymosan (Figura 4.9). Este ensaio apontou uma menor fagocitose em Mφ incubados com meio de estresse nutricional, ao contrário de CC, onde a internalização não alcançou 5% (dado não mostrado).

Entretanto, em 24h na presença das partículas de Zymosan, há um número inferior de macrófagos com partículas internalizadas (Figura 4.10).



**Figura 4.9. Avaliação da internalização de formas tripomastigotas mortas em macrófagos submetidos ao estresse nutricional.** Células foram submetidas à indução autofágica e colocadas em contato com parasitos mortos. (A) Percentual de internalização de parasitos mortos por Mφ, (B) quantidade de parasitos internalizados em células controle (barra branca) ou com meio de estresse nutricional (barra cinza escura) (n=3;  $p < 0,05$ , *Mann-Whitney t test*).



**Figura 4.10. Avaliação da internalização de partículas de Zymosan em células submetidas ao estresse nutricional.** (A) Percentual de internalização e (B) partículas endocitadas de Zymosan /Mφ no grupo controle (barra branca) ou com meio de estresse nutricional (barra cinza escura) (n=3;  $p < 0,05$ , *Mann-Whitney t test*).

### 1.5. Avaliação da inibição da autofagia por silenciamento de genes da via autofágica

Para verificar se a autofagia influenciava na interação, células MEF deficientes na expressão de ATG5, com superexpressão de LC3 conjugado a GFP foram utilizadas. O percentual de infecção e a razão de parasitos por célula foi semelhante ao observado em CC após 90 min (parasito/100 células - CC:  $20,4 \pm 3,1$  x MEF:  $18,9 \pm 3,8$ ) ou 24h (parasito/100 células - CC:  $34,2 \pm 4,5$ ; MEF:  $35,0 \pm 4,8$ ). Por fim, realizamos o ensaio de incubação prévia com o meio de estresse nutricional seguido

interação de 90 min ou 24h (MOI 50 e 10, respectivamente) em MEF ATG5<sup>+/+</sup> e ATG5<sup>-/-</sup>, avaliando a presença de pontos de LC3-GFP (Figura 4.11) e a infecção (Figura 4.12). Células deficientes para ATG5 apresentaram citoplasma esverdeado, sem pontuação característica de conversão de LC3-II (Figura 4.11A). O estresse nutricional induziu um aumento significativo do número de pontos em 24h (Figura 4.11B)

Em relação a infecção, foi observada uma redução em 24h nas células ATG5<sup>+/+</sup>, após a incubação com meio de estresse nutricional, enquanto nas células ATG5<sup>-/-</sup> a infecção foi cerca de 1,5x maior (Figura 4.12A). Em contrapartida, o parâmetro número de parasitos/célula hospedeira não apresentou variação (Figura 4.12B).



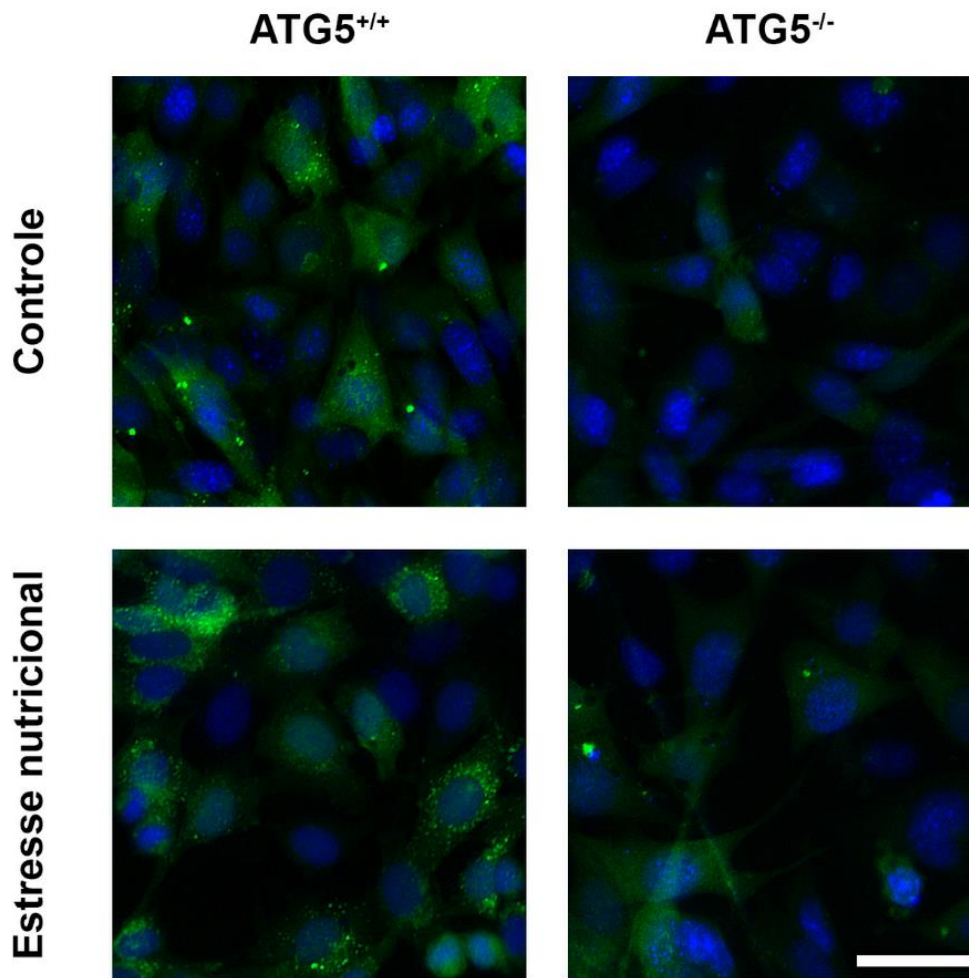


Figura 4.11. Avaliação da infecção e indução autofágica em células MEF. Painel representativo de células MEF ATG5<sup>+/+</sup> e ATG5<sup>-/-</sup> com superexpressão de LC3-GFP (verde). Em azul: núcleos marcados com DAPI. Barra: 20 $\mu$ m

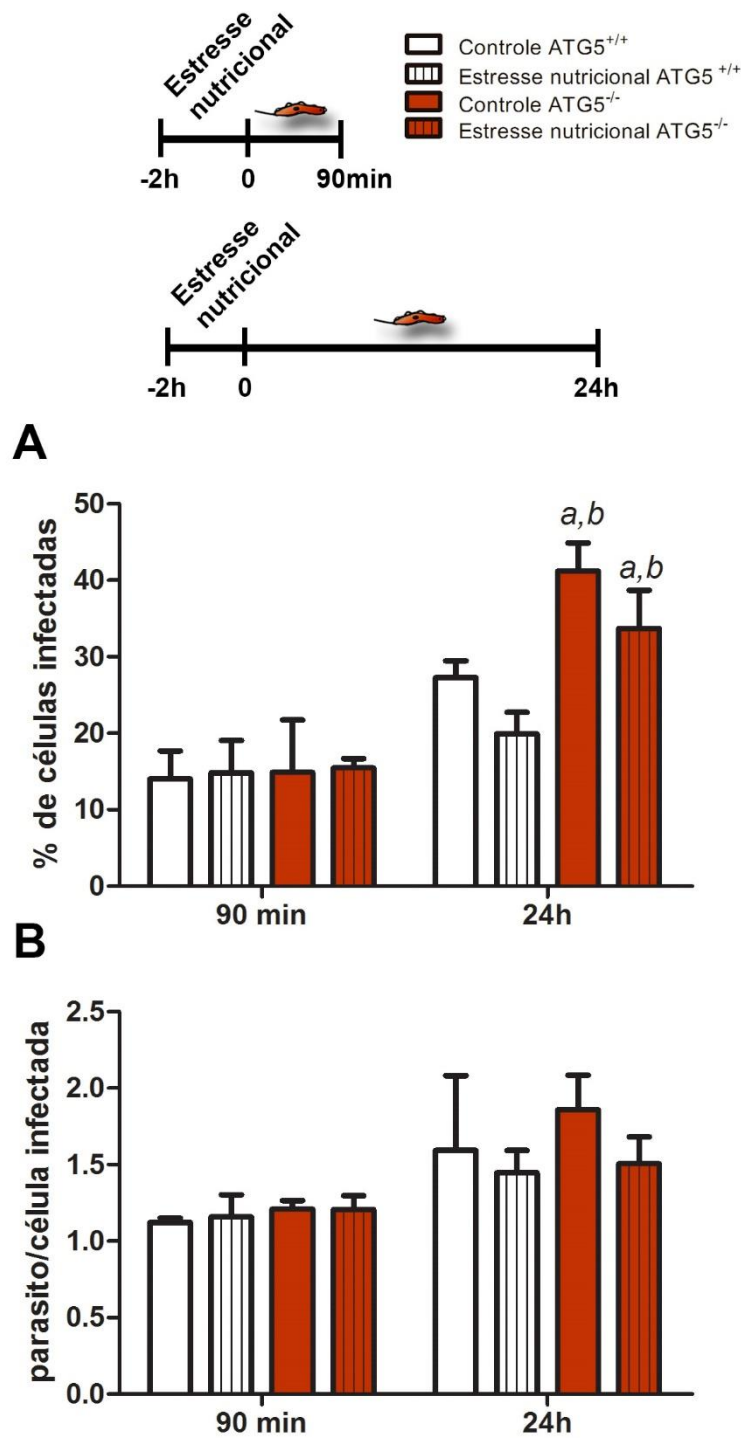


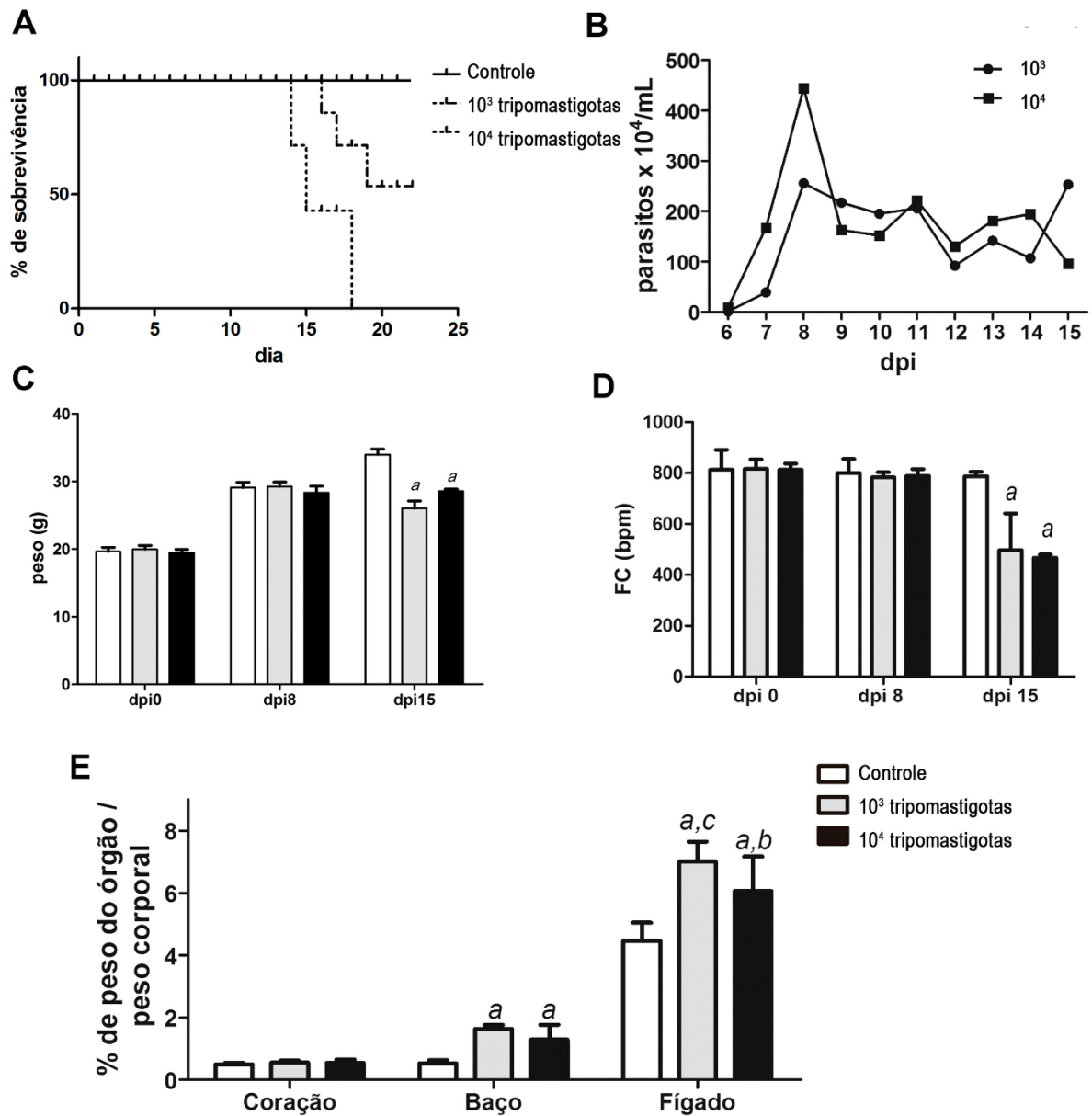
Figura 4.12. Avaliação da infecção por *T. cruzi* em células MEF ATG5<sup>+/+</sup> e ATG5<sup>-/-</sup>. (A) Percentual de infecção de MEF em 90 min e 24h (B) parasito/ célula infectada (n=3; <sup>a,b</sup> p<0,01, *Two-way ANOVA t test*).

## 2. *In vivo*

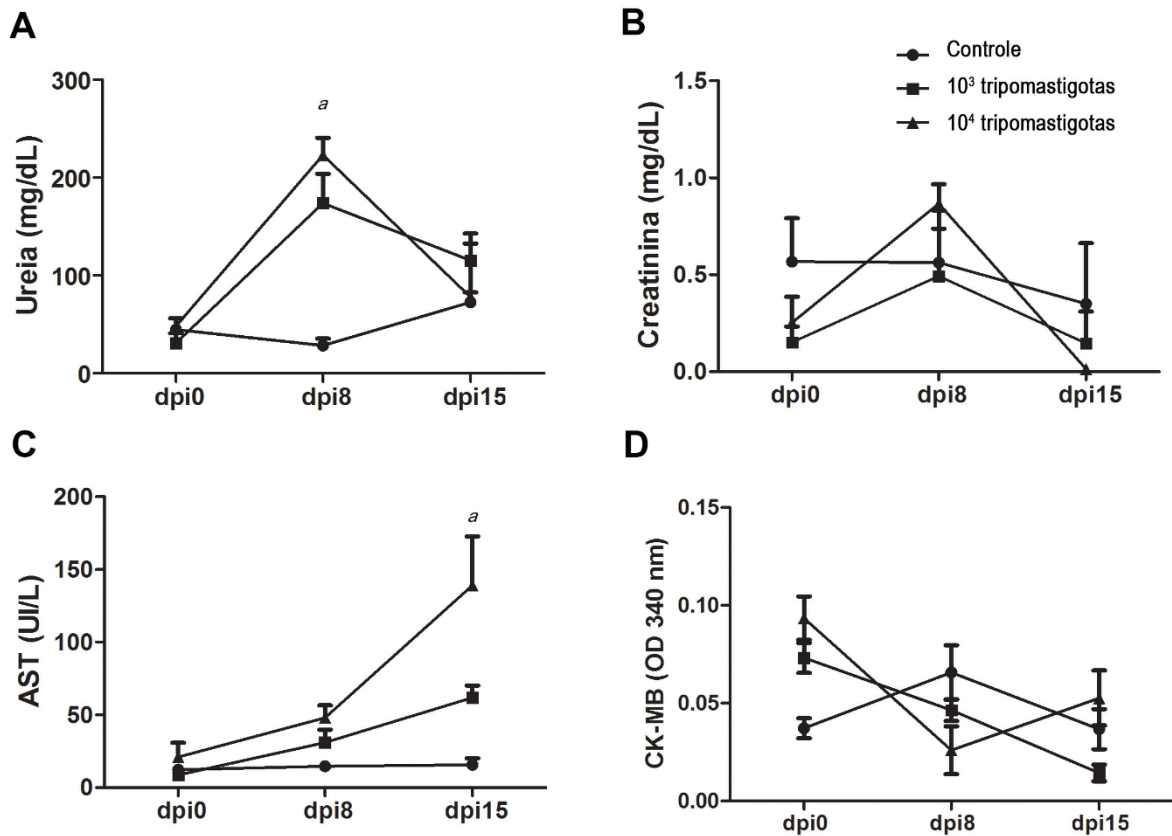
### 2.1. Análise autofagia na infecção aguda no modelo murino

Não apenas a infecção *in vitro* pode ser modulada pela autofagia e por isso avaliamos também se a infecção experimental teria influência. Inicialmente, fomos padronizar o inóculo a ser utilizado nos ensaios *in vivo* subsequentes. Para tal, utilizamos  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^4$  formas tripomastigotas, analisando a mortalidade, curva de parasitemia circulante, peso e ECG (Figura 4.13). Com o inóculo de  $1 \times 10^4$  parasitos, a mortalidade no dpi 15 chegou a 30%, o que não foi observado após o mesmo período com o inóculo menor (onde a mortalidade no dpi 22 alcançou 50%) (Figura 4.13A). Ambas curvas de parasitemia apresentaram dois picos (dpi 8 e dpi 11-12) (Figura 4.13B), sem diferença significativa entre os dias.

Com relação ao peso, apenas no dpi 15 foi observada perda de peso corporal nos animais infectados (Figura 4.13C). Apesar disso, não houve diferenças significativas entre animais infectados na razão peso do órgão por peso corporal para baço e fígado e, no coração, não houve alteração frente ao grupo não infectado (Figura 4.13E). Já no ECG, os animais infectados apresentam menor frequência cardíaca (FC) no dpi 15 (Figura 4.13D), com pelo menos 90% de animais com bloqueio atrioventricular (BAV), 50% de bradicardia além da presença de nos animais arritmia sinusal (9%) e taquicardia (3%) no inóculo de  $1 \times 10^3$  no dpi 15. A avaliação de transaminase hepática (AST), creatinina e ureia e CK-MB mostraram que a infecção nos dpi 8 e 15 são alteradas (Figura 4.14).



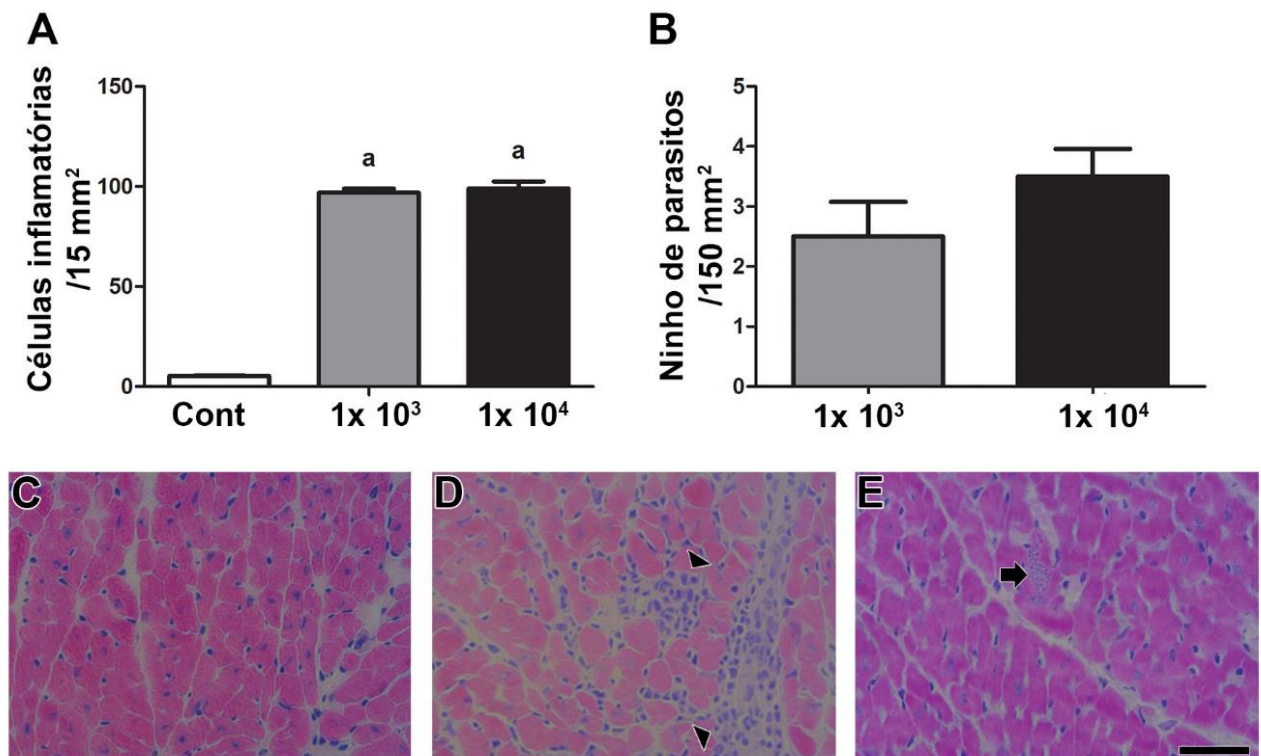
**Figura 4.13. Parâmetros não-invasivos e peso de órgãos dos diferentes inóculos.** (A) mortalidade dos animais Cont (—),  $1 \times 10^3$  (-●-),  $1 \times 10^4$  (····), (B) parasitemia dos inóculos de  $10^3$  (●) e  $10^4$  (■), (C) peso corporal (D) frequência cardíaca (FC), (E) % da razão do peso de órgão/peso corporal de Cont (barra branca),  $1 \times 10^3$  (barra cinza) e  $1 \times 10^4$  (barra preta) (n:3, 4 animais por grupo; curva de sobrevivência:  $a,b,c$   $p < 0,05$ , *Two-way* Anova, Bonferroni *post test*).



**Figura 4.14. Avaliação de dano renal, hepático e cardíaco dos diferentes inóculos.** O plasma foi coletado dos animais individualmente nos dias 0,8 e 15 para análise por ensaio colorimétrico de (A) ureia, (B) creatinina (C) aspartato transferase (AST) (D) CK-MB de Cont (●), 1 x 10<sup>3</sup> (■), 1 x 10<sup>4</sup> (▲) (n:3; <sup>a</sup> p<0,05, Two-way Anova, Bonferroni *post test*).

Para a avaliação do perfil inflamatório, foi realizada a análise por H&E do infiltrado inflamatório (células inflamatórias por campo) e da quantidade de ninhos de parasito no tecido cardíaco (Figura 4.15). No dpi 8 inicia o aumento o número de células por área analisada nos animais infectados (nos grupos infectados é 50% maior a área ocupada por núcleos), sendo que no dpi15 este número é 4x superior, caracterizando o intenso infiltrado inflamatório, porém sem diferença entre inóculos (Figura 4.15A). Da mesma forma, a análise da quantidade de ninhos de parasitos também não mostrou diferença entre os inóculo (Figura 4.15B). As micrografias

mostram que os infiltrados e os ninhos presentes no miocárdio não diferem entre os animais infectados (Figuras 4.15C-E).



**Figura 4.15. Avaliação cardíaca dos infiltrados inflamatórios e de ninhos de parasitos em diferentes inóculos.** (A) Células inflamatórias/ 15mm<sup>2</sup> e (B) ninhos de parasitos/ 150 mm<sup>2</sup> em 1x10<sup>3</sup> e 1x10<sup>4</sup> tripomastigotas/ animal. (C-E) Painel representativo de camundongos não infectado (C), camundongos infectados com 1 x 10<sup>3</sup> tripomastigotas (D) mostrando infiltrado inflamatório (cabeças de seta preta) e ninho de parasitos (seta preta) em camundongo infectado com 1 x 10<sup>4</sup> tripomastigotas (E) (n:3; *a* *p*<0,05, *One-way* Anova, Bonferroni *post test*).

Realizamos então a análise da expressão de LC3-II no tecido cardíaco após os diferentes inóculos (Figura 4.16). A presença de marcação pontual indicativa de autofagossomos está mais acentuada na área onde há endotélio e vascularização do tecido, sendo maior nos animais infectados (Figura 4.16D). Não foi detectada diferença entre os inóculos, assim como marcação destacada nos ninhos de parasitos ou infiltrados inflamatórios (Figura 4.16 B, C).



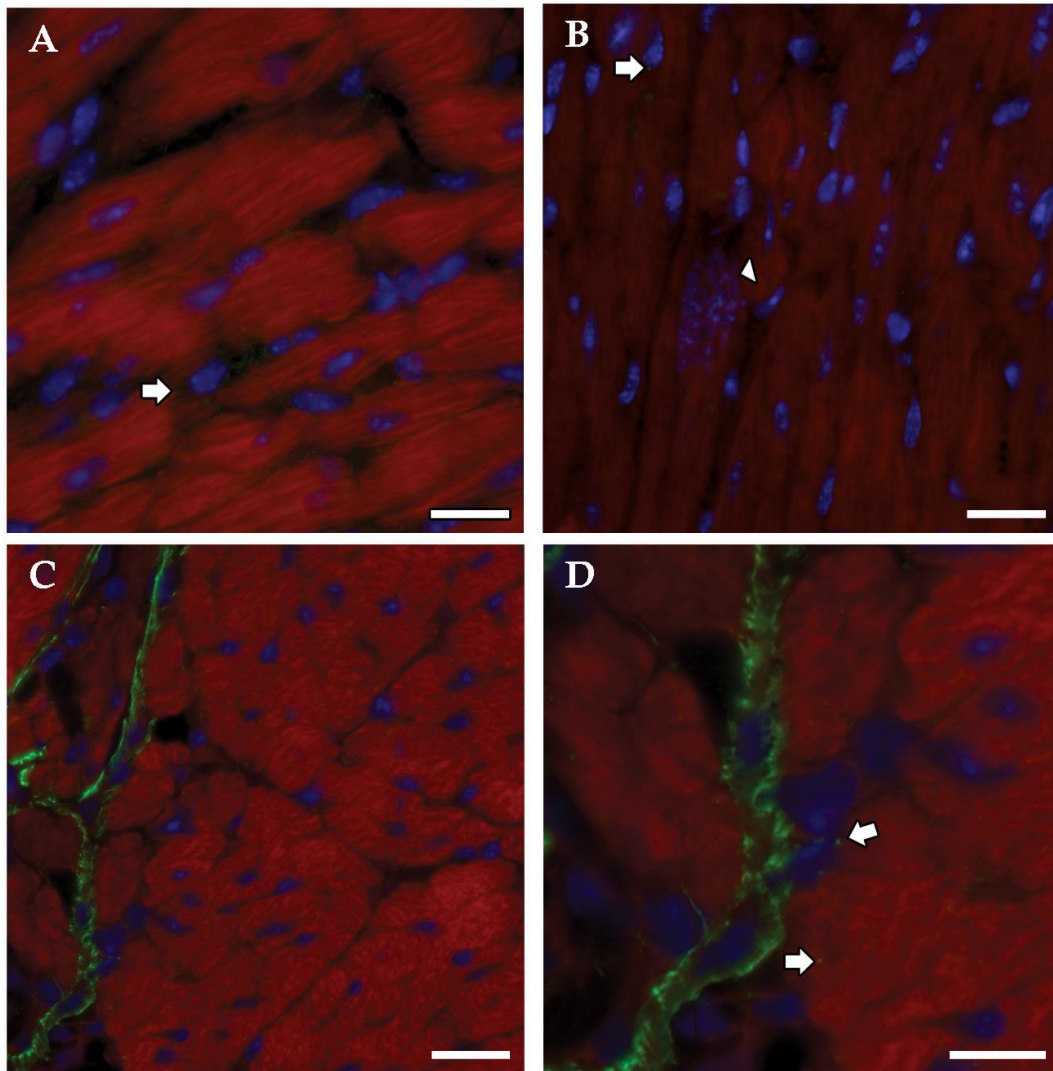


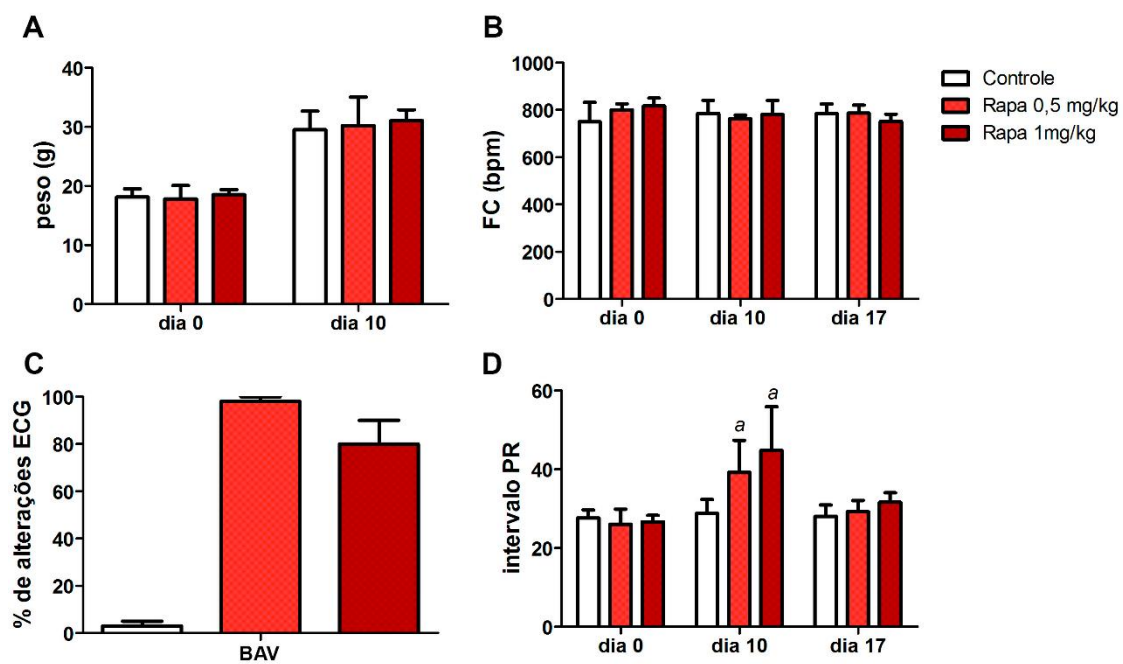
Figura 4.16. Expressão de LC3 no tecido cardíaco de animais controle e infectados com *T. cruzi*. Painel representativo (A) camundongo controle, (B) camundongo com  $10^3$  e (C) camundongo com  $10^4$  tripomastigotas, com destaque (D) para marcação próxima a fibra elástica (verde). LC3 (pontuação verde, setas brancas), presente no tecido cardíaco (contracorado em vermelho com azul de Evans), tanto na célula cardíaca como no infiltrado inflamatório. Em azul, marcação com DAPI; cabeça de seta: ninho de parasitos. Barras: 20  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  (D).

## 2.2. Padronização da indução autofágica em camundongos

Também foi feito o tratamento com rapamicina em camundongos não infectados para avaliar a influência do fármaco no animal, principalmente nos parâmetros analisados na infecção experimental. Foram usadas duas concentrações (0,5 e 1 mg/kg/dia) por 10 dias de tratamento via intraperitoneal. Os animais tratados com rapamicina não tiveram alteração no ganho de peso nem na FC (Figura 4.17 A, B). Contudo, aqui houve maior frequência de BAV no dia 10 (90% dos camundongos tratados, independente da concentração) (Figura 4.17 C) por conta do aumento do intervalo PR (Figura 4.17D). Porém, com a cessão do tratamento de 7 dias, o perfil eletrocardiográfico retornou aos basais de antes do tratamento.

Com relação a danos hepáticos, renais e cardíacos, o uso de rapamicina não levou a alterações significativas em nenhum desses parâmetros (Figura 4.18). A análise histopatológica do coração demonstrou que o tratamento não alterou a organização morfológica do tecido cardíaco (Figura 4.19).





**Figura 4.17. Análise de parâmetros não invasivos em camundongos tratados com rapamicina.**

(A) Peso corporal, (B) FC, (C) % de alterações elétricas – BAV, (D) intervalo PR nos dias 0,10 e 17 nos animais Cont (barra branca), Rapa 0,5 mg/kg/dia (barra laranja), Rapa 1mg/kg/dia (barra vermelha) (n:4;  $a p < 0,05$ , *One-way Anova*, Bonferroni *post test*).

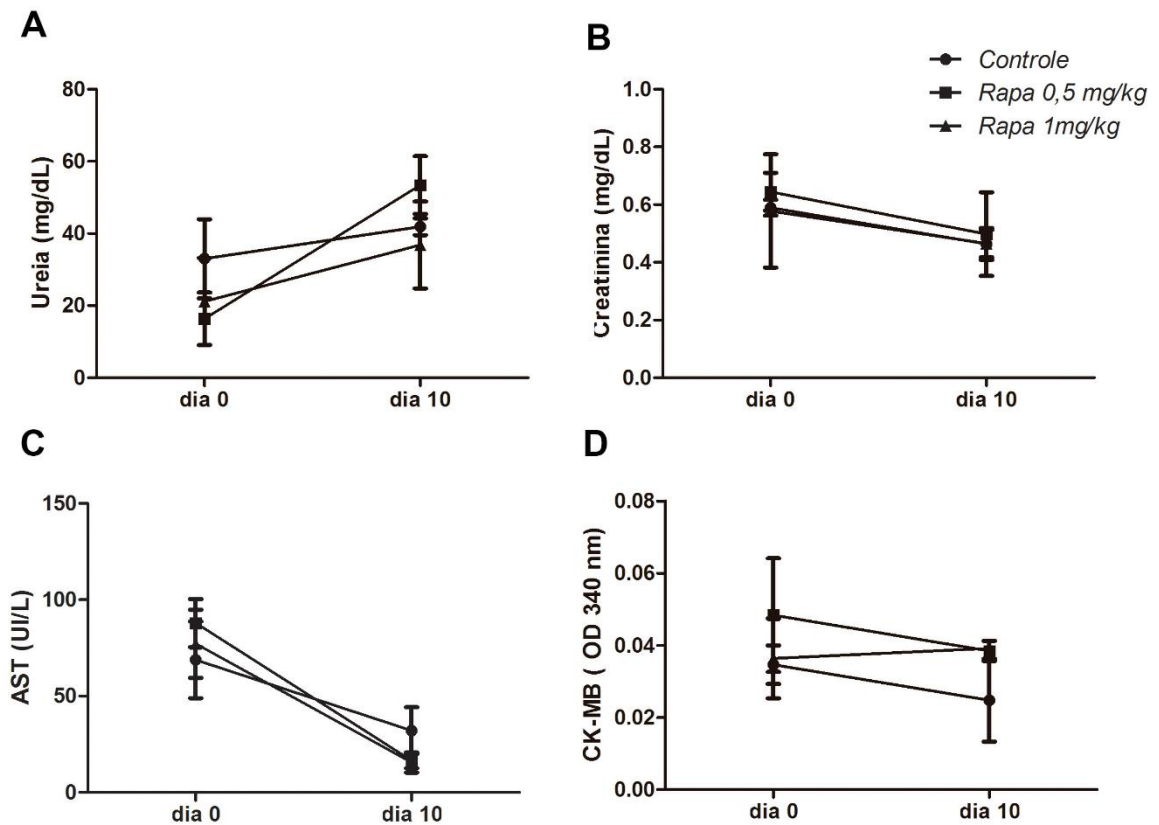


Figura 4.18. Avaliação de dano renal, hepático e cardíaco após tratamento com rapamicina. (A) Ureia, (B) creatinina (C) AST (D)  $\Delta$ CK-MB dos grupos Cont (●), Rapa 0,5 mg/kg/dia (■), Rapa 1mg/kg/dia (▲) (n:4;  $p < 0,05$ , *One-way Anova*, Bonferroni *post test*).

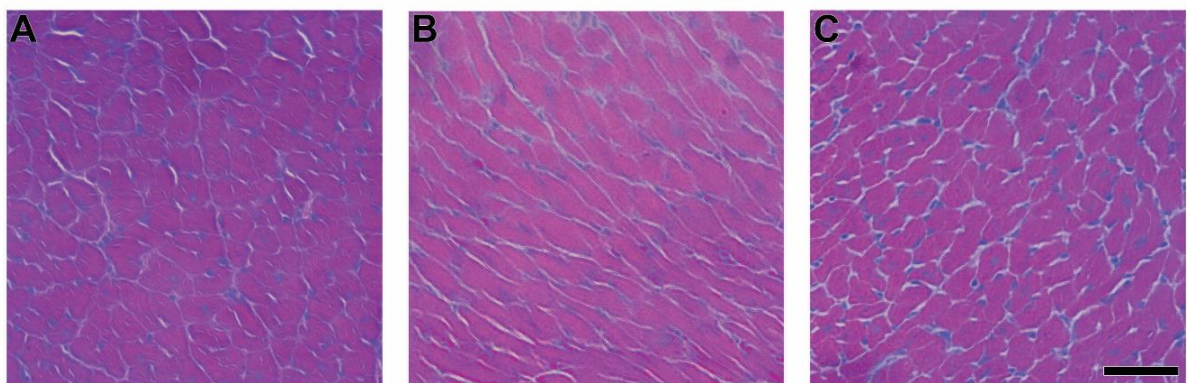


Figura 4.19. Análise histopatológica do miocárdio de camundongos não infectados submetidos ao tratamento com rapamicina. Painel representativo com cortes histológicos corados com HE nos animais Cont (A), Rapa 0,5mg/kg/dia (B), Rapa 1mg/kg/dia (C). Barra: 50  $\mu$ m.

### 2.3. Avaliação da indução autofágica em camundongos infectados

No modelo de infecção aguda, não houve diferença significativa na curva de parasitemia dos animais, tratados ou não com rapamicina (Figura 4.20A). No dpi 15, os animais infectados apresentaram uma redução de peso corporal de 4 e 7,7%, para infectado e infectado + rapamicina, respectivamente, em relação ao dpi 8, apresentando peso médio de 29, 28, 26g e 29,6g, enquanto animais não infectados pesavam cerca de 2-3g, que é 10% a mais (Figura 4.20B).

Contudo, o peso dos órgãos dos animais infectados tratados foi distinto (Figuras 4.20C-F). O coração dos animais apenas infectados foi cerca de 20% superior aos demais grupos (Figura 4.20 C). O peso do baço foi maior nos grupos infectados, entretanto o tamanho do baço do grupo infectado + rapamicina foi cerca de 90% menor que o tamanho do apenas infectado, sendo ainda que os órgãos dos animais dos grupos infectados ao menos 5x maior que dos não infectados (Figura 4.20D). O tamanho do fígado aumentou ao menos 1,2x em relação aos animais não infectados (Figura 4.20E). Já o peso do timo diminuiu nos grupos infectados, decrescendo ainda mais nos animais tratados com rapamicina, no qual o grupo inf + rapa mostrou uma redução de 46%, comparada à infecção (Figura 4.20F).

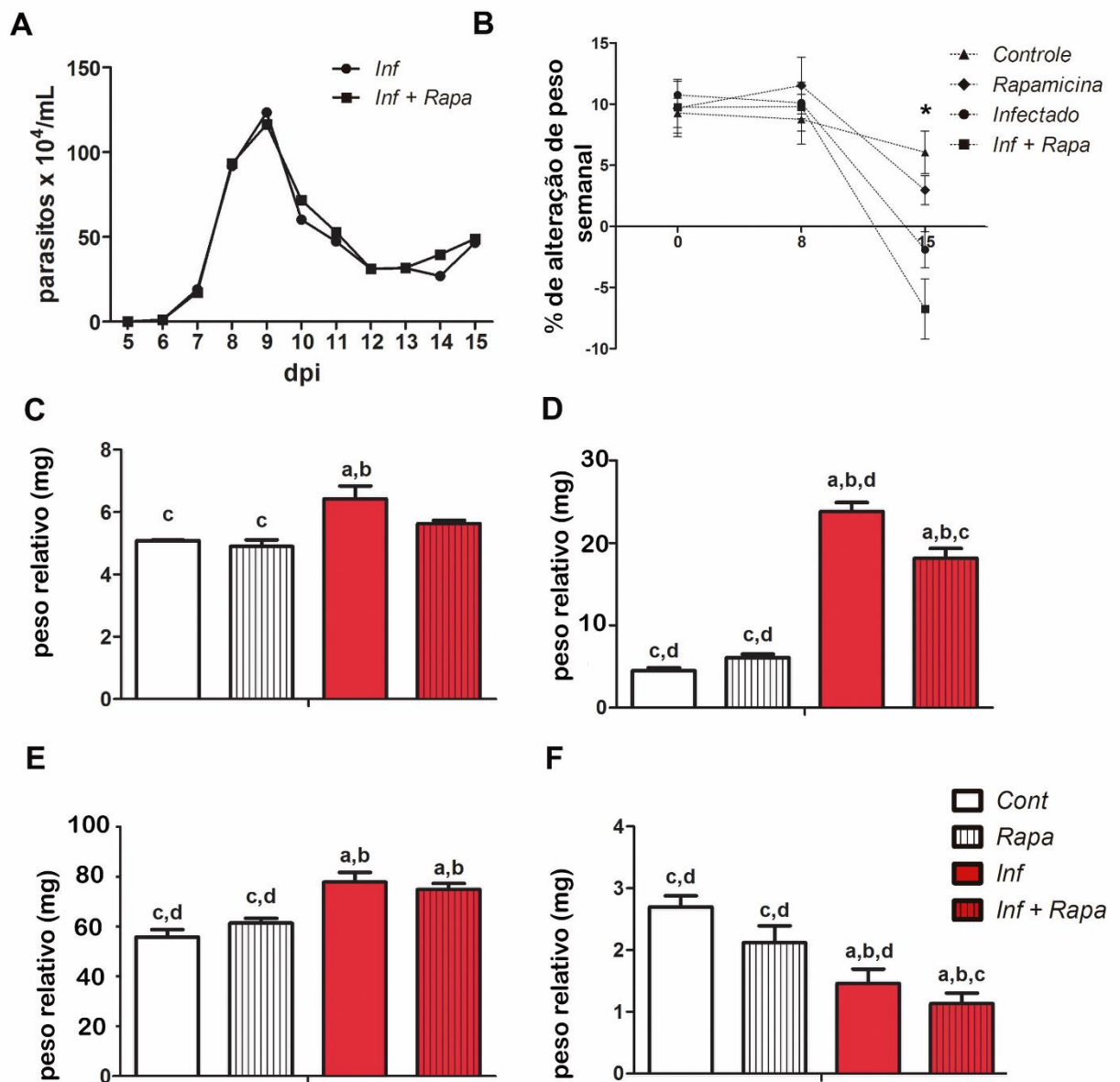
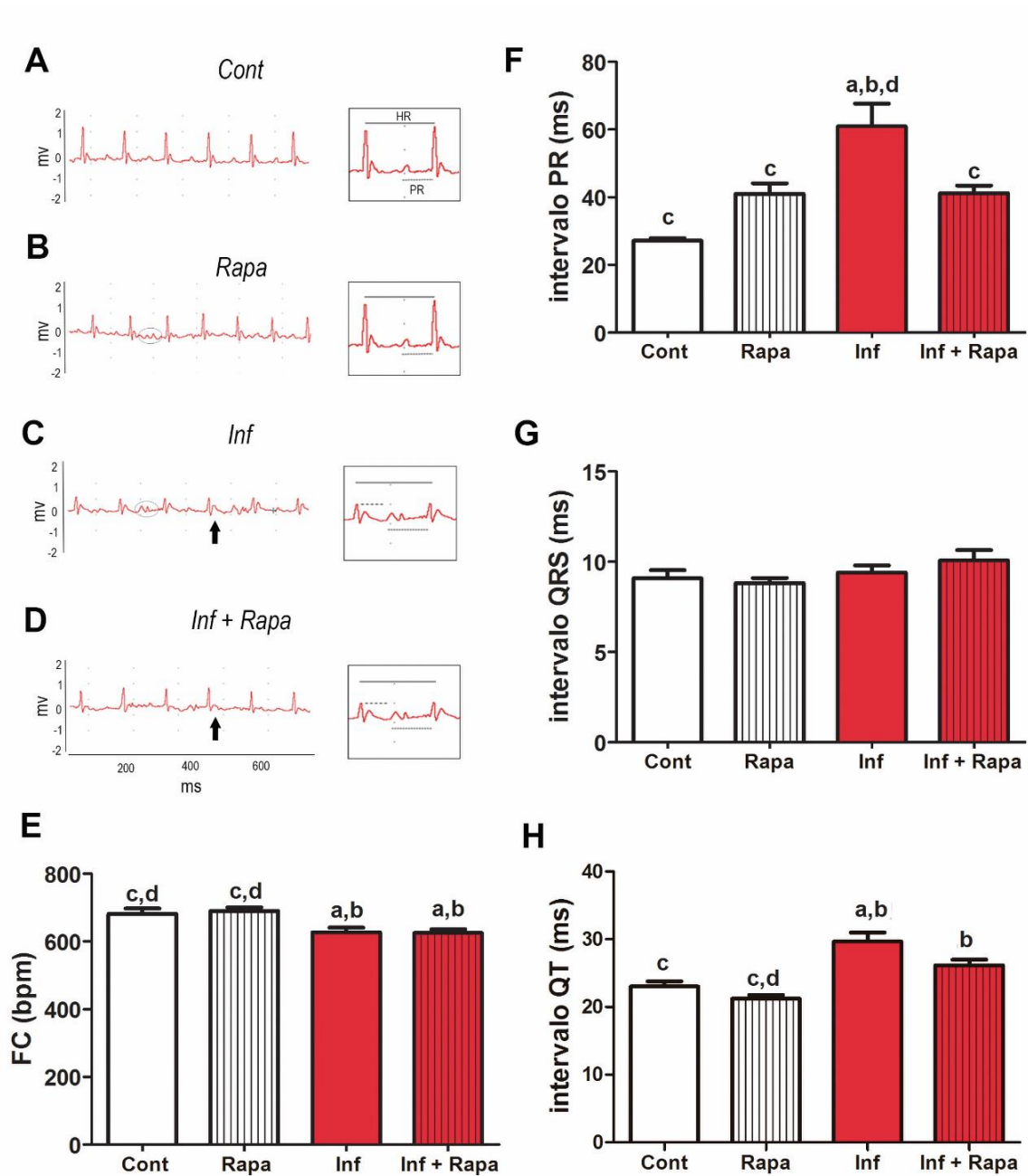


Figura 4.20. Parasitemia, ganho de peso e razão de órgãos de animais infectados e/ou tratados com rapamicina. (A) Parasitemia, (B) % de ganho de peso semanal nos grupos Cont (▲), Rapa (◆), Inf (●), Inf + Rapa (■) (C-F) % do peso do coração (C), baço (D), fígado (E) e timo (F) sob o peso corporal. Cont: controle, Rapa: rapamicina 1mg/kg/dia; Inf: infectado; Inf + Rapa: infectado + rapamicina 1mg/kg/dia (n:4; \* para diferença entre animais infectados e não infectados;  $a-p < 0,05$ , *One-way* Anova, Bonferroni *post test*).

Foram feitas as análises dos traçados eletrocardiográficos, demonstrados na Figura 4.21A-D. No dpi 15, a infecção decresce a frequência cardíaca (Figura 4.21 E), ocorrendo o aumento do intervalo PR nos grupos rapa, inf e inf+rapa, demonstrados pelos BAV, observado em pelo menos 75% dos animais (Cont: 0%, Rapa: 75%, Inf: 75%, Inf+rapa: 100%). De modo interessante, o tratamento com rapamicina de animais infectados não aumentou o intervalo PR (Figura 4.21 F). Não houve alterações no intervalo QRS (Figura 4.21 G). Já o intervalo QT também foi alterado apenas pela infecção, com valores reduzidos nos animais tratados com rapamicina apenas (Figura 4.21H).

Nas análises bioquímicas, a ureia e creatinina mostraram valores superiores estatisticamente nos animais apenas infectados (Figura 4.22 A, B). A ureia no dpi 8 dos animais apenas infectados era 10x superior aos animais não infectados, decaindo no dpi 15, porém ainda 4x superior. Já a creatinina é maior no grupo infectado apenas 6x em relação aos animais não infectados e infectado + rapamicina. Não foram observadas, contudo alterações nos dias analisados para ALT (alanino transferase) e AST (Figura 4.22 C, D). Com relação ao dano cardíaco, avaliado pela CK-MB, os animais infectados apenas apresentaram maiores valores em relação aos demais grupos, no entanto o grupo infectado tratado com rapamicina reduziu 60% em relação ao infectado no dpi 15 (Figura 4.22 E).



**Figura 4.21. Análises eletrocardiográficas dos animais infectados e/ou tratados com rapamicina.** (A-D) Painel representativo dos traçados ECG dos animais controle (A), rapamicina (B), infectado (C) infectado + rapamicina (D), indicando pela seta o intervalo QT e pelo círculo o BAV, com duas ondas P. (E) FC, (F) intervalo PR, (G) intervalo QRS, (H) intervalo QT em milissegundos (n:8 animais por grupo; a-d p<0,05, *One-way Anova*, Bonferroni *post test*).

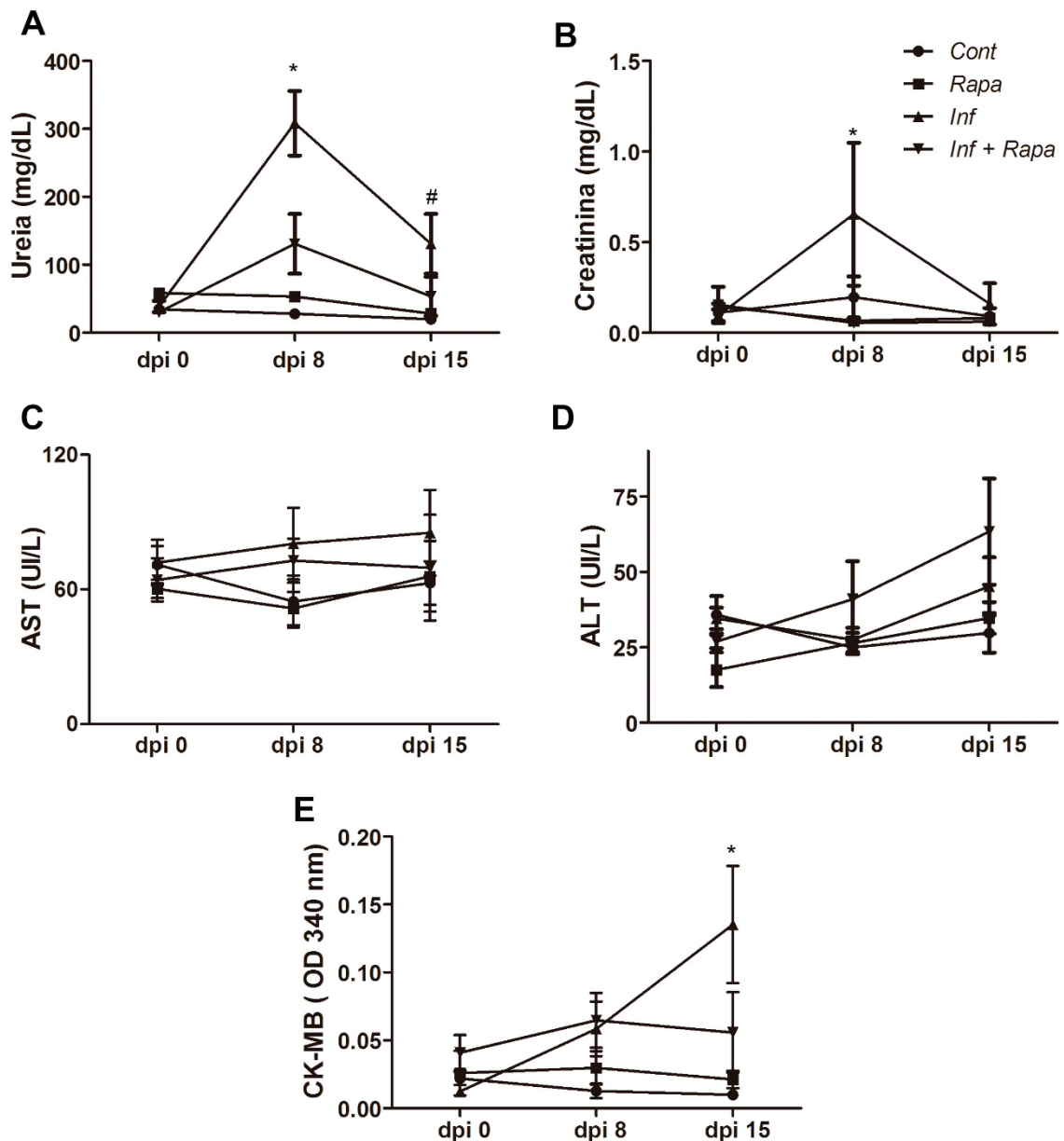
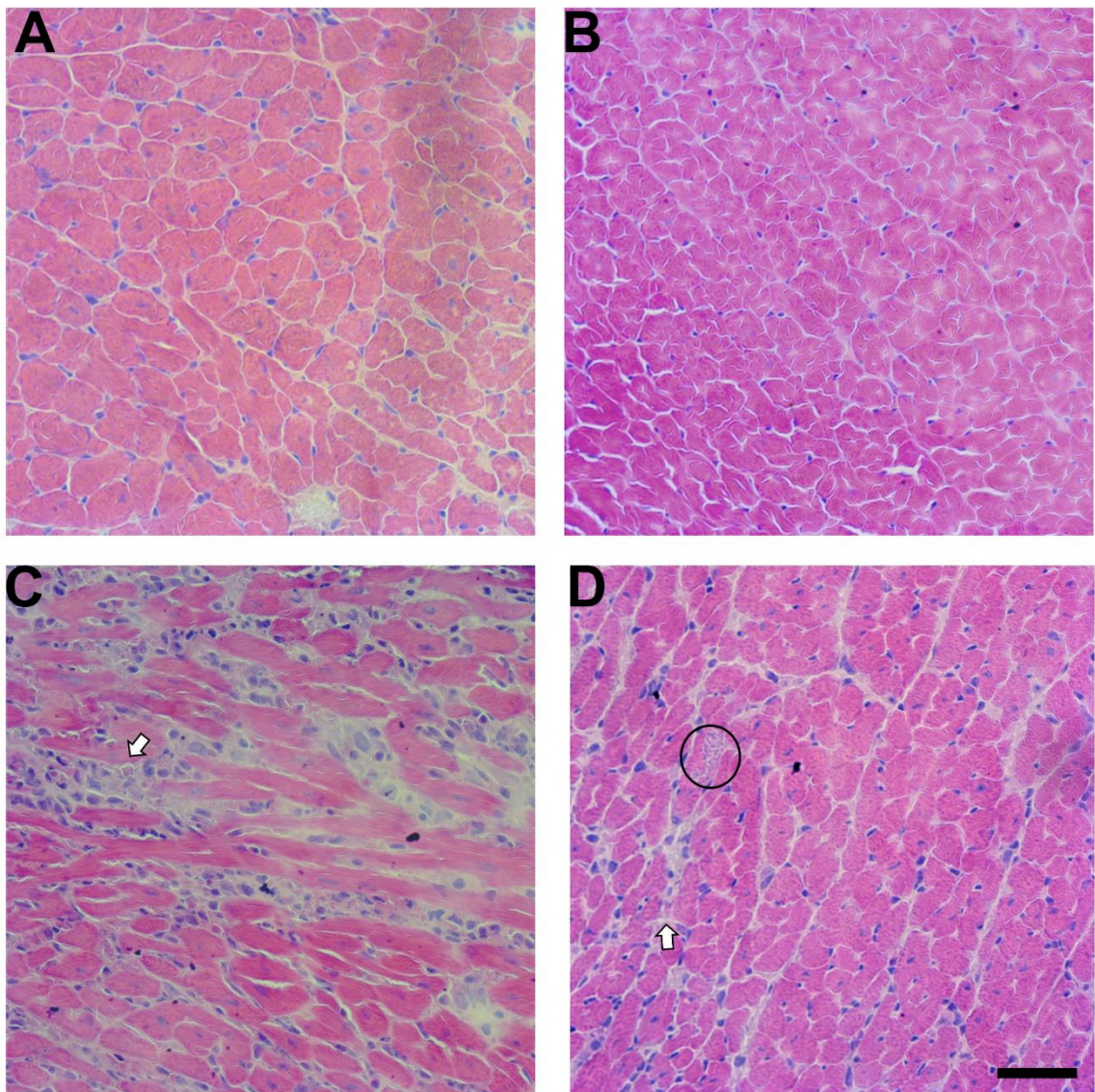


Figura 4.22. Análise toxicidade renal, hepática e cardíaca na infecção e sob o tratamento com rapamicina. O plasma foi coletado nos dias 0,8 e 15 para análise de (A) ureia, (B) creatinina (C) AST (D) ALT e (E) CK-MB (n:8;  $p < 0,05$  \* para inf vs cont, rapa, inf + rapa; # para inf vs cont, rapa, *Two-way* Anova, Bonferroni *post test*).





**Figura 4.23. Análise histológica do miocárdio de camundongos infectados e/ou submetidos ao tratamento com rapamicina.** Painel representativo com cortes histológicos corados com HE nos animais controle (A), rapamicina (B), infectado (C) e infectado + rapamicina (D). A seta branca indica um infiltrado inflamatório e o círculo, um ninho de amastigotas Barra: 50  $\mu$ m.

Foram feitas análises do infiltrado inflamatório e ninho de amastigotas por HE (Figura 4.23). Nos camundongos Cont e Rapa, não são observados infiltrados inflamatórios ou alterações no perfil das células cardíacas (Figura 4.23A, B). Os animais de Inf e Inf + Rapa apresentam ninhos de amastigotas com tamanhos



variados, e diferentes infiltrados inflamatórios, com menor quantidade no grupo tratado com rapamicina (Figura 4.23 C, D e Figura 4.24A). A avaliação dos cortes histológicos mostrou o maior número de núcleos celulares nos grupos infectados e que não há diferença entre os animais infectados na quantidade de ninhos de amastigotas, como também sem distinção na área ocupada pelos ninhos nos cortes analisados (Figura 4.24 C, D), embora como demonstrado na micrografia há uma tendência de área maior no grupo tratado. A análise dos infiltrados inflamatórios mostrou o maior número de células inflamatórias por campo analisado no grupo apenas infectado, alcançando 2,4x (Figura 4.24 E), além da área ocupada ser 2x superior ao grupo infectado + rapamicina (Figura 4.24F). Não foram observados infiltrados inflamatórios nos grupos Cont e Rapa.

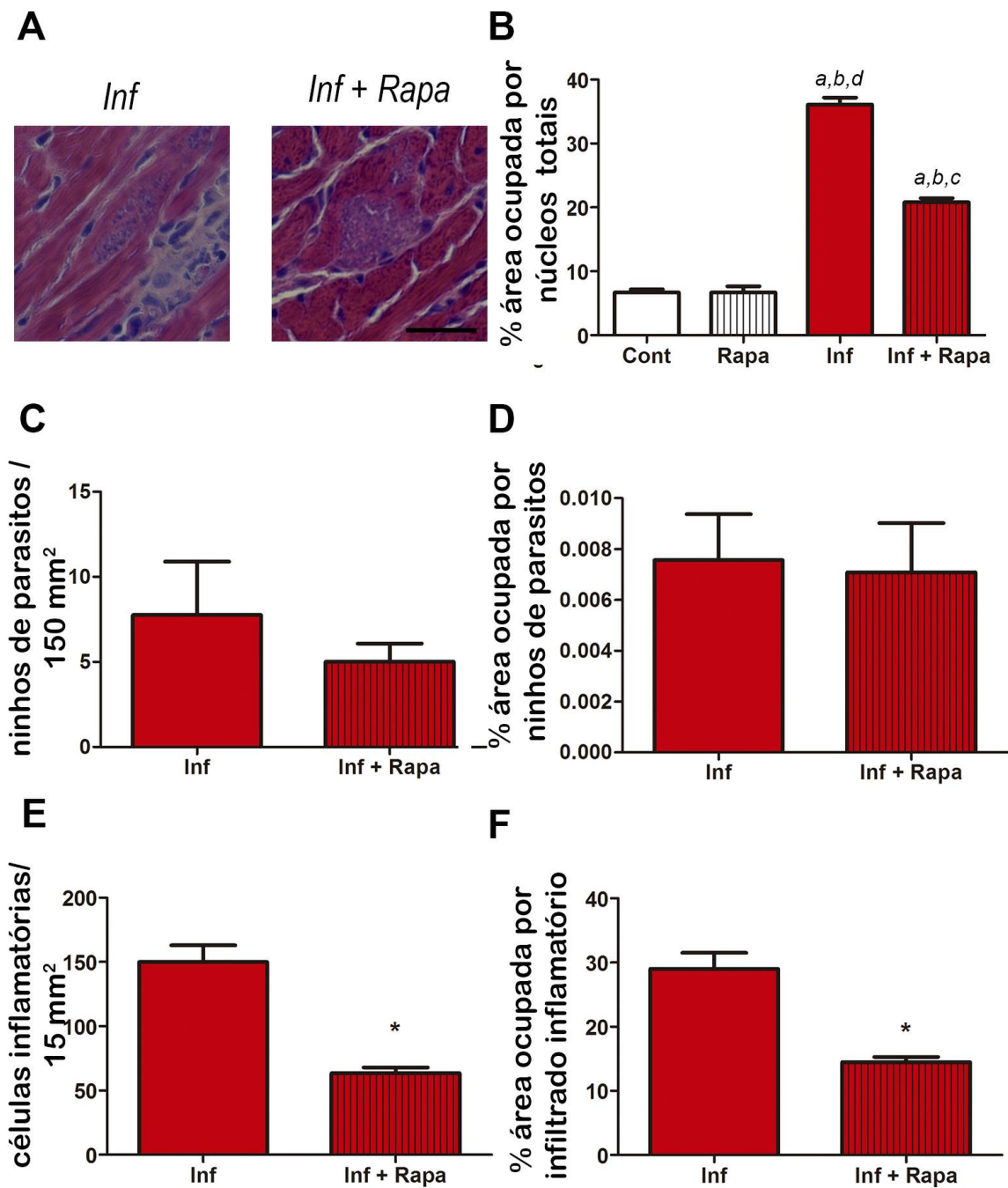


Figura 4.24. Modulação do infiltrado inflamatório dos camundongos infectados e infectados tratados com rapamicina. (A) Painel representativo com cortes histológicos corados com HE, destacando os ninhos de Infectado e Infectado + rapamicina, barra: 50 μm. (B) quantidade de ninhos de amastigotas por 10 campos por animal avaliado; (C) % da área ocupada por imagem dos ninhos (analisados em 200x); (D) % da área ocupada por núcleos totais; (E) células inflamatórias e (F) % da área ocupada por infiltrado inflamatório (n:8 animais por grupo; \*p<0,05, *Mann-Whitney t test*, a-d p<0,05, *One-way Anova*, Bonferroni *post test*).

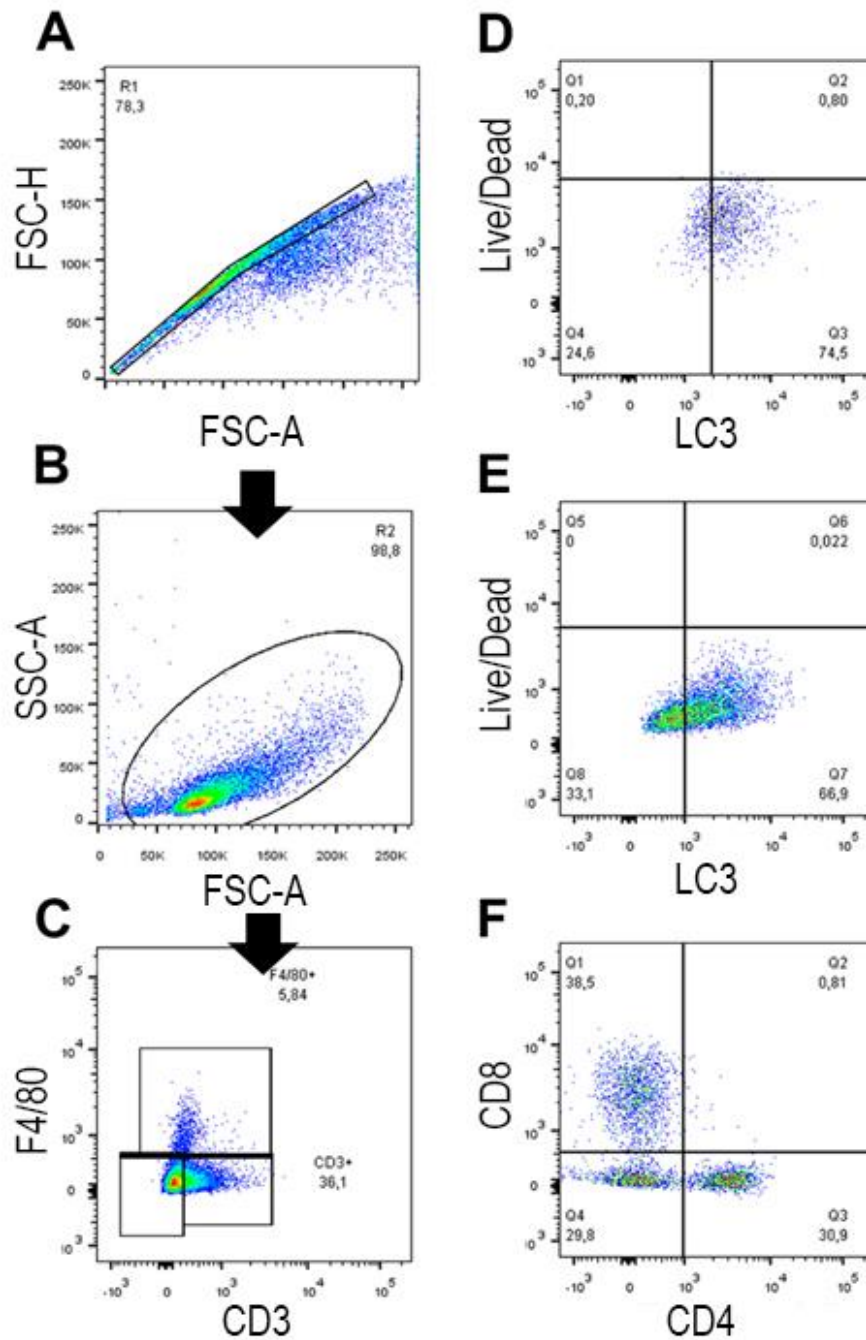
Para verificar a expressão de LC3 em diferentes populações celulares e também do perfil de morte celular, realizou-se a análise das células do peritônio, timo, baço e coração por citometria de fluxo. Para todos os grupos, a análise foi feita, após exclusão de grumos.

No peritônio, foi demarcado a região de linfócitos como de macrófagos (Figura 4.25). As análises mostraram que há uma maior expressão de LC3 nas células de animais infectados que do que controle, sem diferenças significativas para camundongos não infectados com rapamicina. Além disso, o MFI do grupo infectado é superior ao menos 1,3x aos animais tratados, principalmente na população macrofágica (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1. Percentual de células LC3+ no peritônio e intensidade de fluorescência (MFI).**

	<b>F4/80 + LC3+</b>	<b>MFI – F4LC3</b>	<b>CD3+LC3+</b>	<b>MFI - LC3</b>
<b>Cont</b>	93,2 ± 8,4	1846	27,5 ± 10,1	1500
<b>Rapa</b>	89,1 ± 6,4	1434	15,6 ± 7,7	1407
<b>Inf</b>	75,2 ± 10,1	3208	66,4 ± 14,3	1991
<b>Inf + Rapa</b>	96,1 ± 3,4	2434	69,8 ± 12,2	2156

MFI: mediana de intensidade de fluorescência (n:2).



**Figura 4.25.** A análise da expressão de LC3 em diferentes populações celulares do peritônio. Painel representativo do peritônio (grupo infectado), com (A) exclusão de grumos, (B) gráfico de morfologia FSC x SSC, (C) gráfico de pontos de F4/80 (macrófago) x CD3 (linfócito T). A partir da população F4/80<sup>+</sup> foi feita o gráfico de pontos de LC3 x Live/Dead (D) e na população CD3<sup>+</sup> foi realizado o mesmo o gráfico de pontos (E). Para avaliar a população CD3<sup>+</sup> LC3<sup>+</sup>, foi usado o gráfico de pontos CD4 x CD8 (F) (n;2).

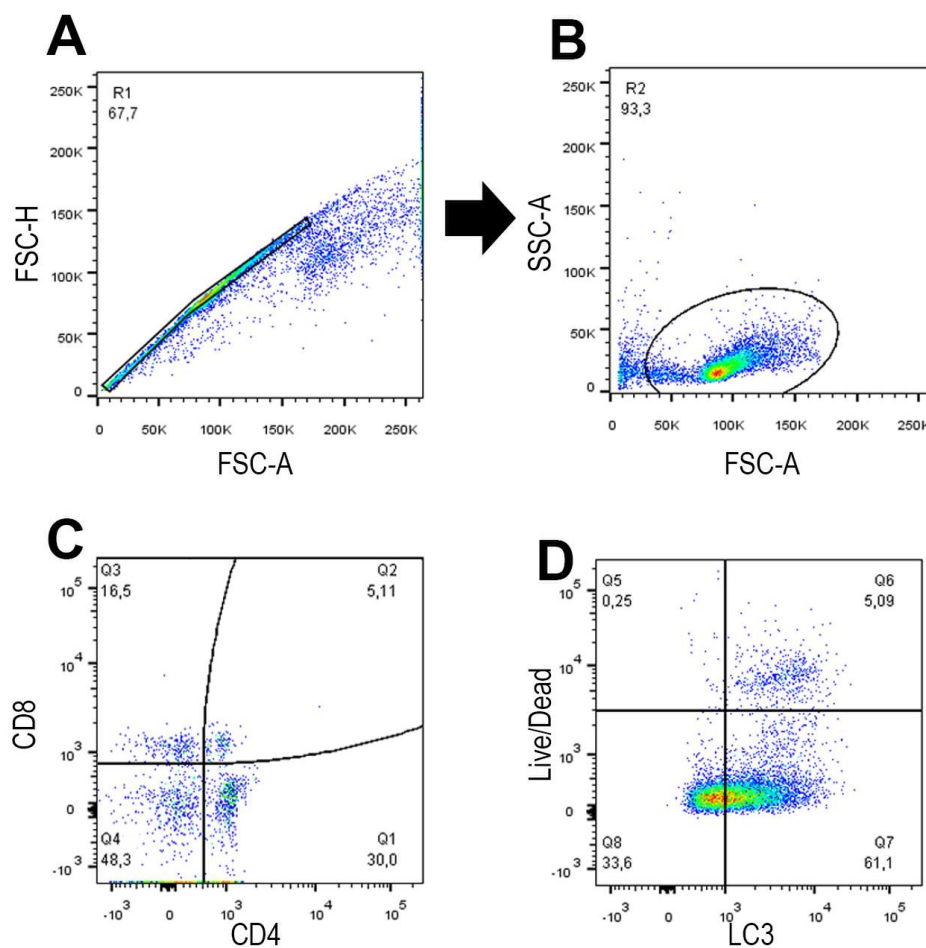
Na população de linfócitos T com expressão de LC3, o maior percentual de linfócitos T citotóxicos foi observado nos grupos infectados e, no grupo infectado + rapamicina, ocorreu um decréscimo na população CD4<sup>+</sup> (Tabela 4.2). Essa marcação reflete o número de células CD3<sup>+</sup> nos grupos, confirmando que a marcação de LC3 é homogênea.

**Tabela 4.2. Percentual de células CD3<sup>+</sup>LC3<sup>+</sup> no peritônio.**

	CD4 SP	CD8 SP	DN	DP
<b>Cont</b>	30,6 ± 12	9,8 ± 4	59 ± 10	0,5±0,01
<b>Rapa</b>	41,5 ± 5	9,1 ± 2,5	48,2 ± 4	1,2 ±0,3
<b>Inf</b>	30,9 ± 11	38,5± 5	29,8 ± 7	0,8 ±0,2
<b>Inf + Rapa</b>	16,7 ± 7	33,3±12	48 ± 8	1,9 ± 0,4

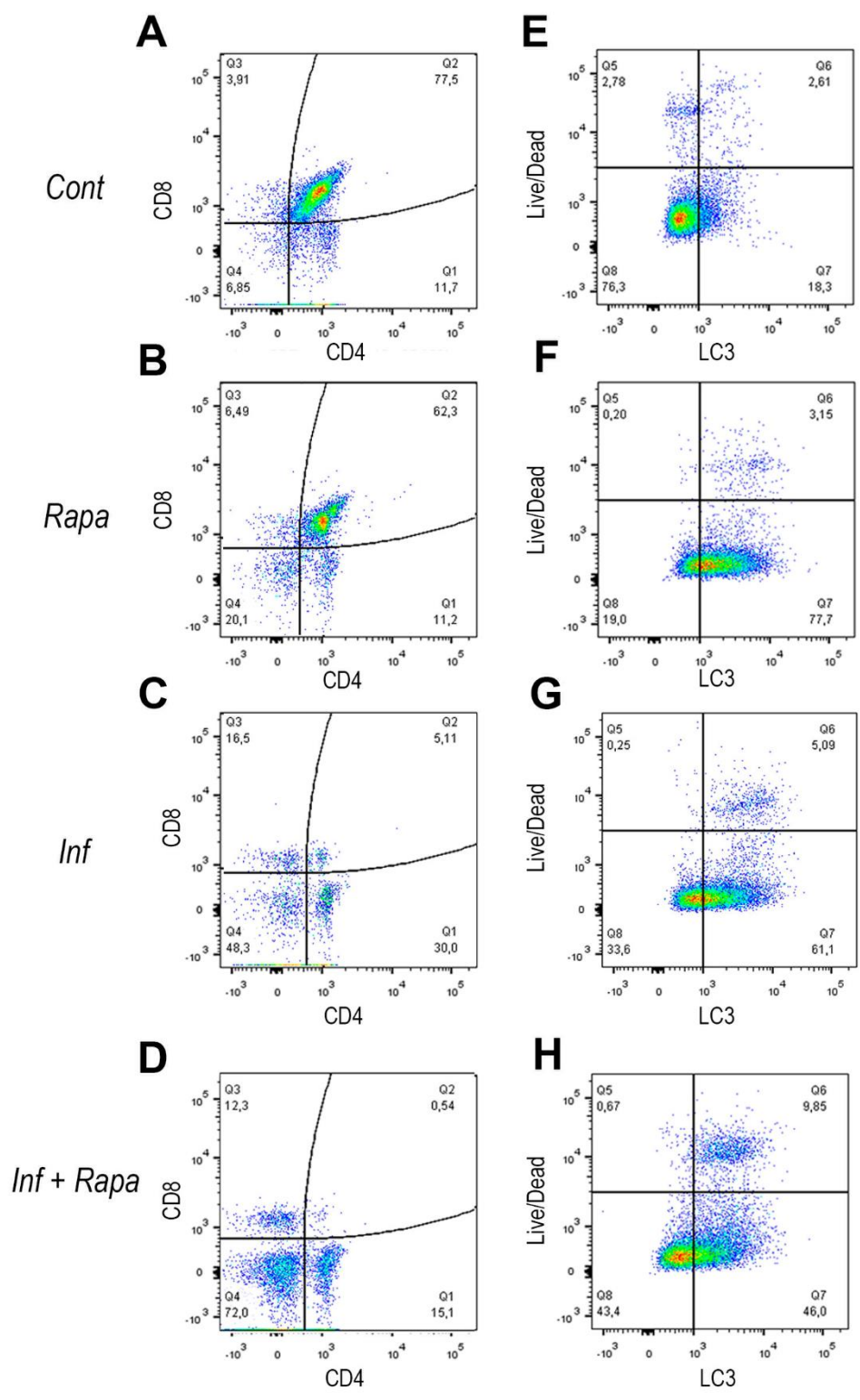
SP: simples positiva; DN: duplo negativa; DP: duplo positiva (n:2).

Avaliou-se também no timo a modulação da população de linfócitos T, assim como a marcação para LC3 e morte celular (Figura 4.26). A população de análise foi determinada em FSC x SSC, seguido de gráfico de pontos de CD4 x CD8 (Figura 4.26 A-D).



**Figura 4.26. Gráfico de pontos para análise do timo.** Painel representativo do timo (grupo infectado), com (A) exclusão de grumos, (B) gráfico de morfologia FSC x SSC, (C) gráfico de pontos de CD4 x CD8, (D) gráficos de pontos de LC3 x Live/Dead a partir do gráfico B.

Observa-se que há uma perda de células duplo positivas (DP) para CD4 e CD8 nos grupos infectados, com enriquecimento das populações simples positivas (SP) para CD4 e CD8 nesses grupos. O tratamento com rapamicina nos animais infectados parece acentuar a queda de populações DP ainda mais (Figura 4.27 A-D). Com relação à viabilidade dos timócitos, o grupo controle mostra-se positivo para Live/Dead distribuindo-se de maneira semelhante em LC3<sup>+</sup> e LC3<sup>-</sup>, enquanto os animais apenas tratados com rapamicina há um enriquecimento da população LC3<sup>+</sup>Live/Dead<sup>+</sup> (Rapa: 3,15%). Esse enriquecimento é maior ainda nos animais infectados (Inf: 5,09; Inf+rapa:9,85). O mais interessante é o maior número de eventos LC3<sup>+</sup> para: inf + rapam, inf, rapa, de modo crescente (Figura 4.27 E-H).



**Figura 4.27. Modulação da população tímica na infecção por *T. cruzi* e no tratamento com rapamicina.** (A-D) Painéis representativos da população CD4 e CD8 e (E-H) da população LC3 e Live/Dead do timo, selecionadas a partir do gráfico de pontos de FSC x SSC, como descrito na Figura 4.27 (n:2).

Para verificar qual população apresentava mais LC3 e a intensidade de fluorescência do MFI de LC3, a partir do gráfico LC3SP foi feito o percentual de células CD4 e CD8 (Tabela 4.3). Verifica-se que o aumento da população CD4 SP nos grupos infectados também ocorre nas células LC3SP. A população LC3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>não parece ser modulada entre os grupos. Em contrapartida, a população LC3<sup>+</sup>DP não decresce como observado no total de eventos, reduzindo o percentual de células DN nos grupos infectados. Com relação ao MFI, foi observado que, diferente do peritônio, o MFI é mais alto no grupo rapamicina, com valores próximos ao infectado e infectado + rapamicina.

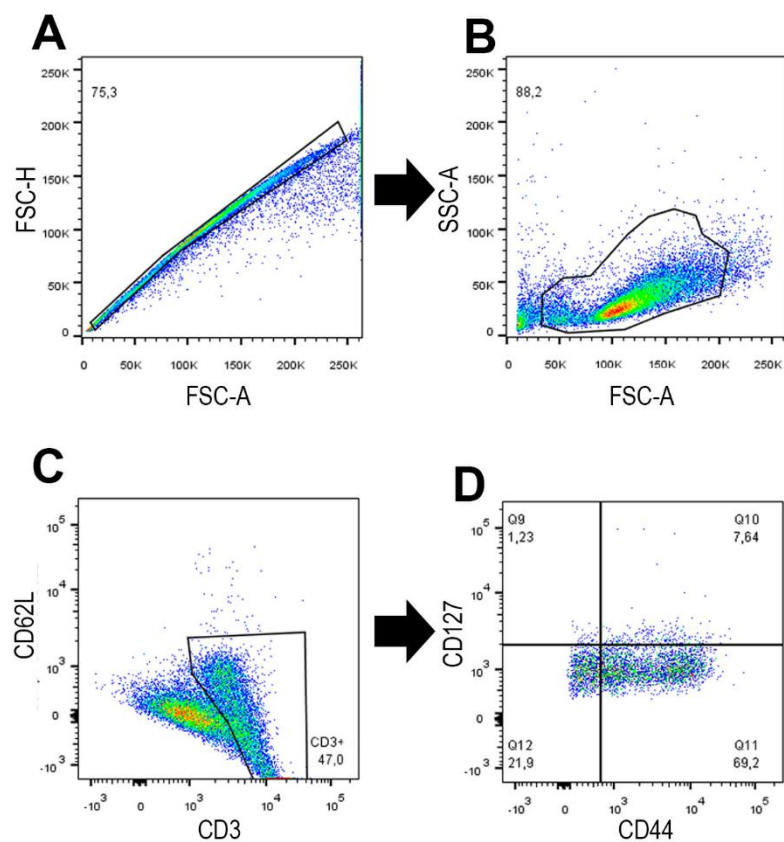
**Tabela 4.3. Percentual de células LC3<sup>+</sup> no timo e intensidade de fluorescência de LC3 -MFI.**

	CD4 SP	CD8 SP	DP	DN	MFI - LC3
<b>Cont</b>	16,9 ± 4,4	9,7 ± 4,5	39,3 ± 8,5	34,0 ± 1,5	1278
<b>Rapa</b>	10,5 ± 3,6	11,0 ± 7,0	52,6 ± 7,7	24,8 ± 3,7	1867
<b>Inf</b>	42,0 ± 1,1	17,3 ± 1,3	23,2 ± 4,6	17,3 ± 2,9	1738
<b>Inf + Rapa</b>	35,5 ± 9,8	15,3 ± 4,5	28,6 ± 13,0	20,5 ± 0,3	1744

SP: simples positiva; DN: duplo negativa; DP: duplo positiva; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (n:2).

Avaliou-se no baço se o perfil de memória era alterado com o tratamento com rapamicina (Figura 4.30), assim como a distribuição das células com marcação para LC3 (Figura 4.31). Para a análise de memória, foi determinada a marcação da região CD3<sup>+</sup> e, a partir desta, um gráfico de pontos de populações CD127 e CD44, avaliando posteriormente a população CD4 x CD8 (Figura 4.28).





**Figura 4.28.** Gráfico de pontos para análise da população de células de memória no baço. Painel representativo do baço (grupo infectado), com (A) exclusão de grumos, (B) FSC x SSC, (C) seguido de análise em CD3 x CD62L, no qual avaliou-se a população CD3<sup>+</sup>, analisando (D) CD44 x CD127. Como no timo e peritônio, também foi realizada a análise de população CD4 x CD8 (n=2).

O tratamento com rapamicina não alterou percentualmente as populações CD4 e CD8 no baço, embora nos animais infectados há um aumento dos números percentuais de CD4 SP (Figura 4.29 e Tabela 4.4).

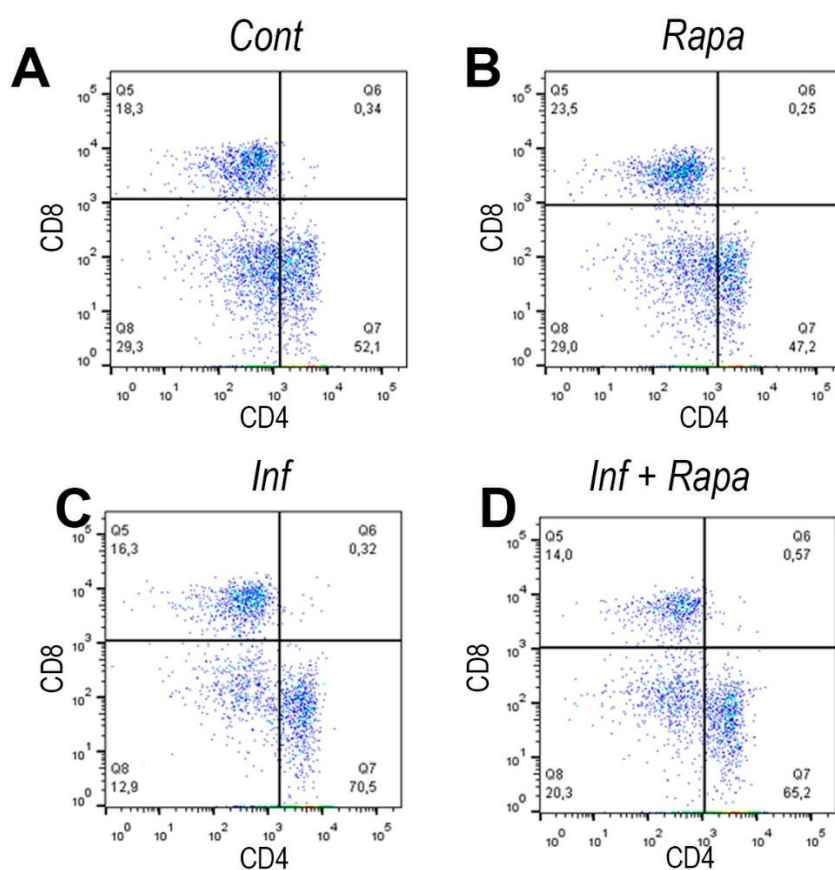


Figura 4.29. Modulação da população de linfócitos T no baço na infecção e/ou tratamento com rapamicina no baço. Após determinação de região de morfologia de análise, as células CD3<sup>+</sup> foram avaliadas para CD4 e CD8 nos grupos (A) controle, (B) rapamicina, (C) infectado e (D) infectado + rapamicina (n:2).

Tabela 4.4. Percentual de células CD3<sup>+</sup> no baço e número de eventos adquiridos

	CD4 SP (%)	CD8 SP (%)	DN (%)	DP (%)	CD4 SP	CD8 SP	DN	DP
<b>Cont</b>	54,2 ± 2,8	15 ± 5,2	27,2 ± 2,1	0,4 ± 0,07	3550 ± 183	1493 ± 340	1769 ± 137	26 ± 4
<b>Rapa</b>	50,5 ± 4,0	24,7 ± 1,9	29,0 ± 0,8	0,3 ± 0,1	3573 ± 285	1765 ± 135	2072 ± 36	25 ± 4
<b>Inf</b>	68,6 ± 5,8	16,9 ± 0,7	12,5 ± 0,5	0,3 ± 0,1	6039 ± 515	1500 ± 70	1110 ± 44	27 ± 7
<b>Inf + Rapa</b>	61,7 ± 7,1	15,0 ± 1,1	21,2 ± 1,3	0,6 ± 0,3	3486 ± 395	848 ± 57	1198 ± 60	34 ± 3

SP: simples positiva; DN: duplo negativa; DP: duplo positiva; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (n=2, com grupo de 4 animais cada). Número total de eventos em FSC x SSC: 10000

Ao avaliar a expressão de CD62L, CD44 e CD127, verificou-se um aumento de células de memória efetora nos grupos com rapamicina, com queda percentual e numérica da população efetora em inf + rapa (Figura 4.30). Além disso, nas células CD62L<sup>high</sup> há uma população indeterminada (CD44<sup>high</sup>, CD127<sup>-</sup>) no grupo infectado, por uma provável transição das células ativadas (Figura 4.30A). Ressalta-se que, mesmo com o percentual de células efetoras alto em controle e rapamicina, isso não reflete em células analisadas pois a população corresponde há menos de 10% dos eventos na área de análise (Figura 4.30 B).

A marcação de LC3 foi percentualmente menor em todos os grupos (Figura 4.31). Notou-se que os animais apenas infectados apresentaram menor marcação de LC3, com MFI também maior, porém pequeno comparado aos demais órgãos analisados (Cont: 521; Rapa: 433; Inf: 386; Inf + Rapa: 559). Foram observadas, ainda, um maior número de células em morte, avaliadas por Live/Dead em todos os grupos, com destaque para células CD8<sup>+</sup> e DN nos infectados (Figura 4.31 G, H,K, L).

Como a marcação no baço foi menor, também realizamos, após a coleta dos esplenócitos, o tratamento com leupeptina por 2h seguida de marcação para avaliar a dinâmica de LC3 em CD3<sup>+</sup> (assim como realizado nas demais análises do baço) com adição do inibidor de protease. Todos os grupos, com ou sem tratamento de leupeptina, aumentaram o percentual de células LC3<sup>+</sup> (Figura 4.32). De modo interessante, as células T responderam diferente ao tratamento com o inibidor de fusão lisossomal: enquanto células do baço de animais não infectados reduziram o percentual de marcação, as células dos animais infectados aumentaram a população LC3<sup>+</sup> (Figura 4.32E).

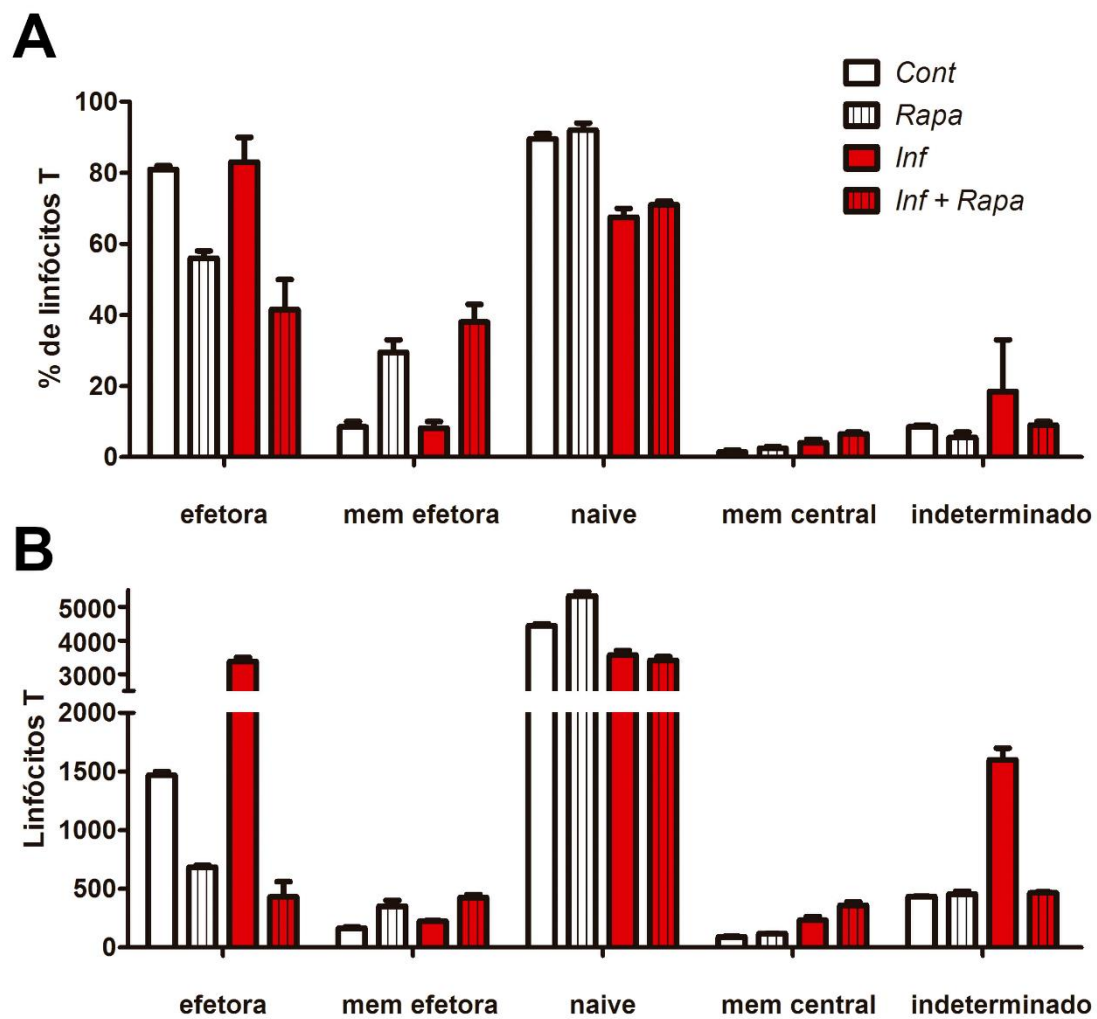
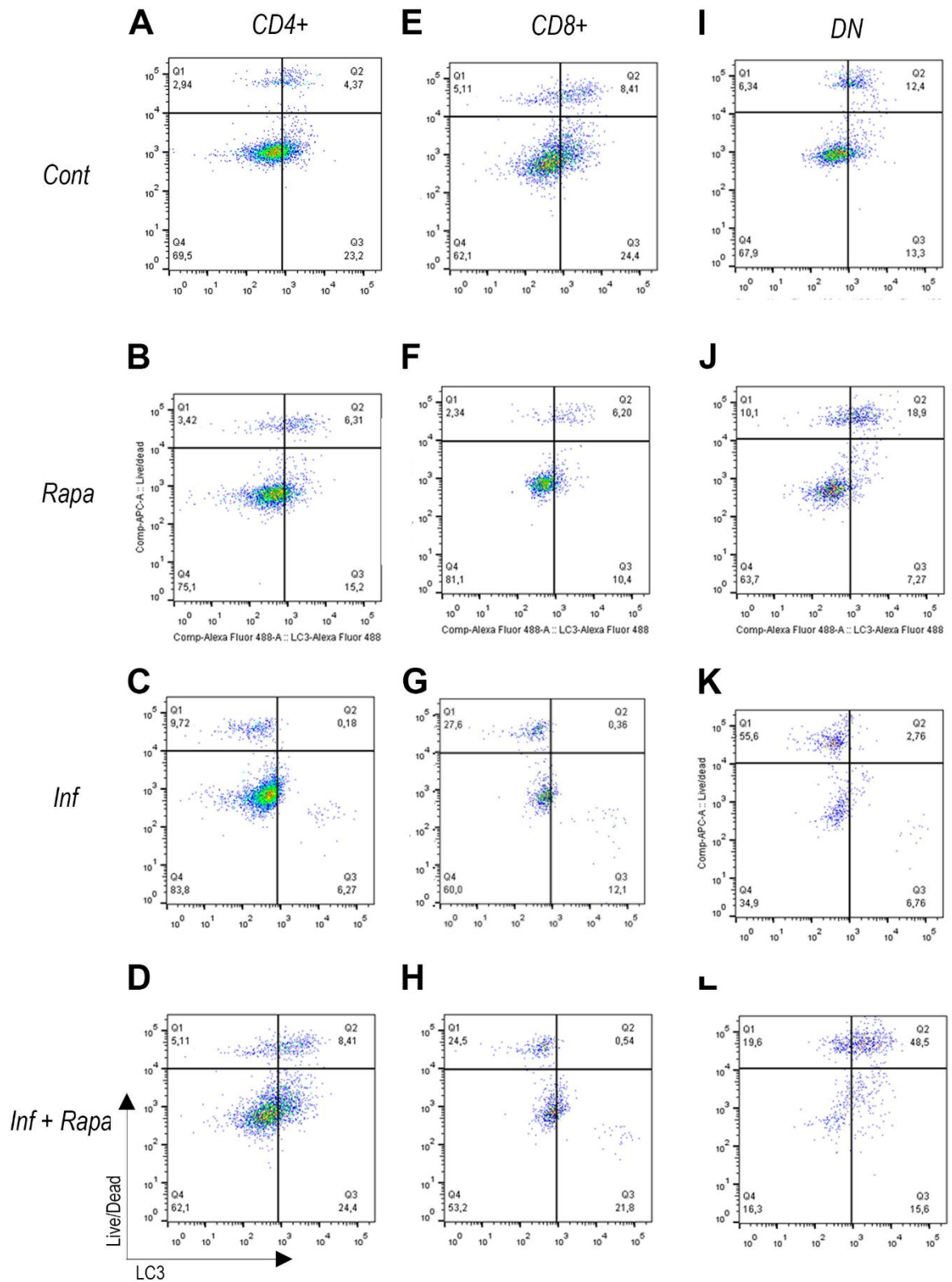
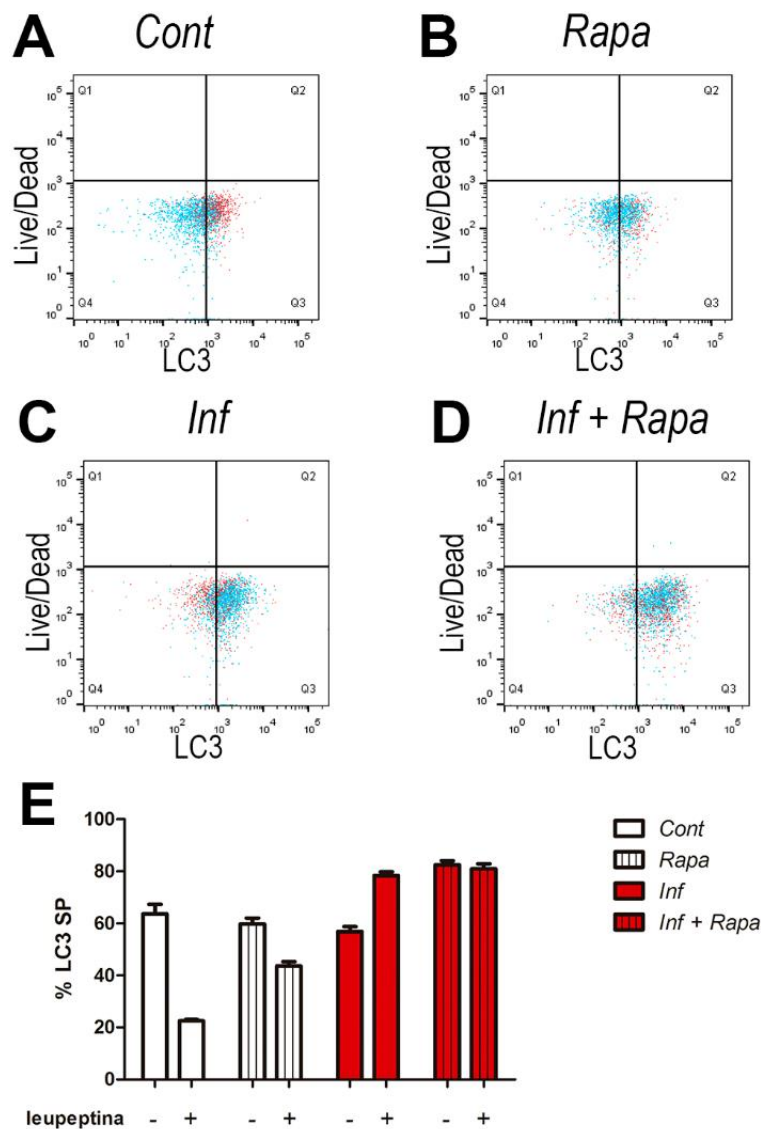


Figura 4.30. Modulação de células T de memória e efetoras no baço durante a infecção e/ou tratamento com rapamicina. (A) Percentual de esplenócitos nas populações CD3<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> (efetora e memória efetora) e CD3<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> (naive, memória central e indeterminado). (B) Número de eventos CD3<sup>+</sup> na região delimitada em FSC x SSC, no total de 10000 (n:2).



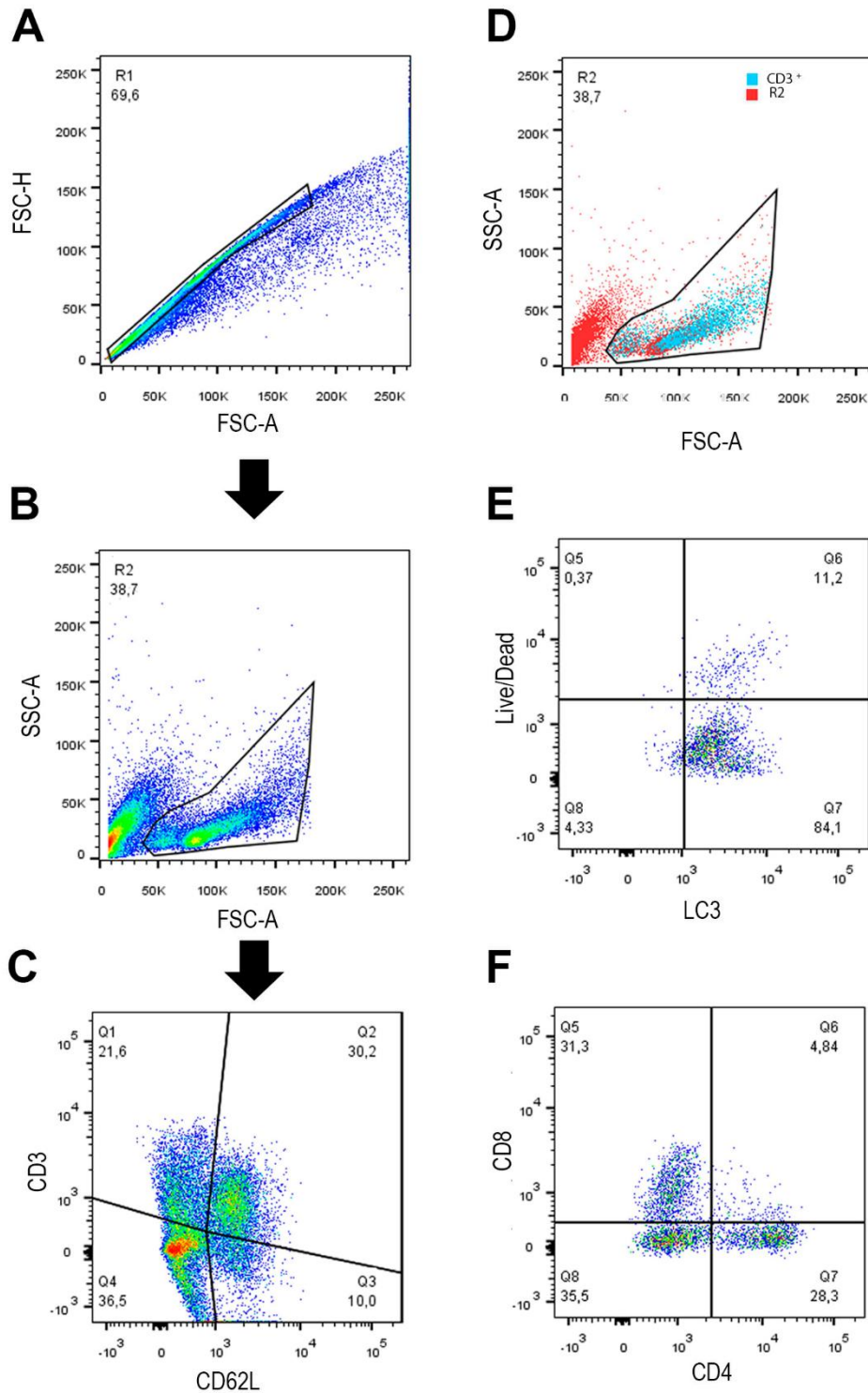
**Figura 4.31.** Modulação de linfócitos durante a infecção e tratamento com rapamicina no baço. Painéis representativos da população (A-D) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, (E-H) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e (I-L) DN (duplo negativa) analisadas para morte celular (Live/Dead) e autofagia (LC3) (n:2).



**Figura 4.32. Avaliação de LC3 após tratamento com leupeptina no baço.** (A-D) Painéis representativos da população CD3<sup>+</sup> submetidas ao tratamento com leupeptina (pontos em azul) ou não (pontos vermelhos) nos grupos (A) controle, (B) rapamicina (C) infectado e (D) infectado + rapamicina, analisadas para morte celular (Live/Dead) e autofagia (LC3). (E) Percentual de células LC3<sup>+</sup> com e sem tratamento de leupeptina (n:2).

No coração, avaliamos a população de células com perfil de memória e efetora, além de morte celular e autofagia (Figura 4.33-36). Para tanto, após a seleção de eventos simples em área e altura (Figura 4.33 A), foi feita no gráfico de tamanho por granulosidade a região provável de linfócitos, confirmada com marcação de CD3 e CD62L (Figura 4.33 C), para exclusão de linfócitos circulantes, analisando as populações residentes no miocárdio apenas

positivas para CD3, confirmando na região de morfologia (Figura 4.33 D), analisando tanto para autofagia e morte celular (Figura 4.33 E) como para CD4 e CD8 (Figura 4.33 F).



**Figura 4.33. Gráfico de pontos para análise da população de células do coração.** Painel representativo do coração (grupo infectado), com (A) exclusão de grumos, (B) gráfico de morfologia FSC x SSC, (C) gráfico de pontos de CD3 x CD62L, (D) gráficos de pontos de morfologia sobrepondo CD3<sup>+</sup> e eventos totais. Análise de (E) LC3 x Live/Dead e (F) CD4 x CD8 foi feita a partir dos eventos CD3<sup>+</sup>, de (C) (n:2).



Inicialmente foi determinado que a aquisição de eventos na área delimitada em R2 (Figura 4.33B) seria de 10000 eventos, contudo para os grupos controle e rapamicina, alcançou-se uma média de 1000 células CD3<sup>+</sup>, dentre as quais 50% apresentavam também marcação CD62L, mostrando linfócitos circulantes. O percentual de células CD3<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> é demonstrado na Figura 4.34A, indicando uma população linfocítica maior nos grupos infectados. Comparando o percentual de células CD3<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> animais infectados aumentaram ao menos 4x o percentual de células CD8, decrescendo a população CD4 (Tabela 4.4).

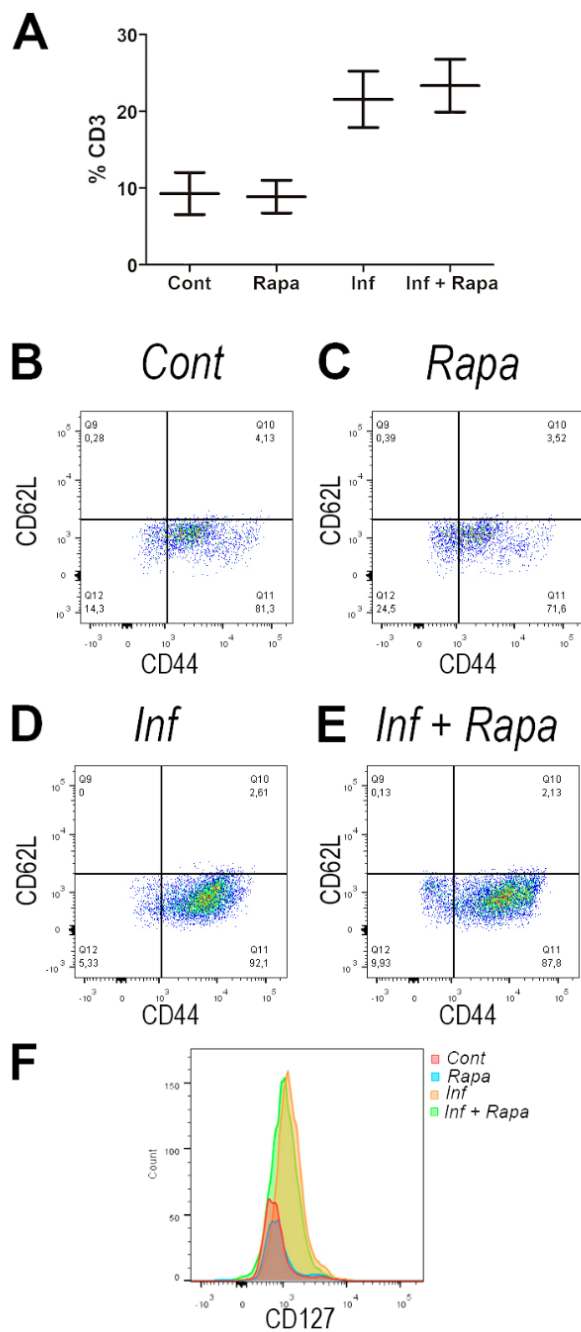
Para avaliar se as células presentes no coração apresentavam perfil de memória, realizou-se após a seleção de células CD3<sup>+</sup>, com a avaliação por gráfico de pontos CD62L x CD44, além da marcação para CD127. Observou-se que as células dos animais infectados apresentam maior expressão de CD44 assim como maior marcação para CD127 (Figura 4.34). Desse modo, ambos grupos mostram maior perfil de células efetoras, com pequena população também de células de memória, mas sem diferenças com o tratamento com rapamicina.

**Tabela 4.4. Percentual médio de células CD3<sup>+</sup> no coração.**

	CD4 SP	CD8 SP	DN	DP
<b>Cont</b>	72,0 ± 1,4	8,4 ± 5,1	18,3 ± 4,0	1,6 ± 0,3
<b>Rapa</b>	69,4 ± 4,1	10,1 ± 6,2	22,4 ± 4,1	2,2 ± 1,1
<b>Inf</b>	28,3 ± 0,4	31,3 ± 3,2	35,4 ± 4,5	3,8 ± 1,4
<b>Inf + Rapa</b>	27,2 ± 3,1	25,8 ± 2,1	41,4 ± 1,2	2,6 ± 0,8

SP: simples positiva; DN: duplo negativa; DP: duplo positivo (n:2).





**Figura 4.34. Avaliação do perfil de linfócitos T no coração.** (A) Percentual de células CD3<sup>+</sup>, (B) histograma expressando população CD3<sup>+</sup>, gráfico de pontos CD44 x CD62L (C) controle, (D) rapamicina, (E) infectado e (F) infectado + rapamicina (n:2).

Finalmente, analisando a população CD3<sup>+</sup> no coração, a marcação de LC3 foi semelhante a população de linfócitos do timo, com menor percentual no grupo controle, infectado + rapamicina, rapamicina, infectado. Há, entretanto, um aumento

da população Live/Dead<sup>+</sup>, principalmente na população infectado + rapamicina, que pode estar associada ao processo de dissociação enzimática (Figura 4.35).

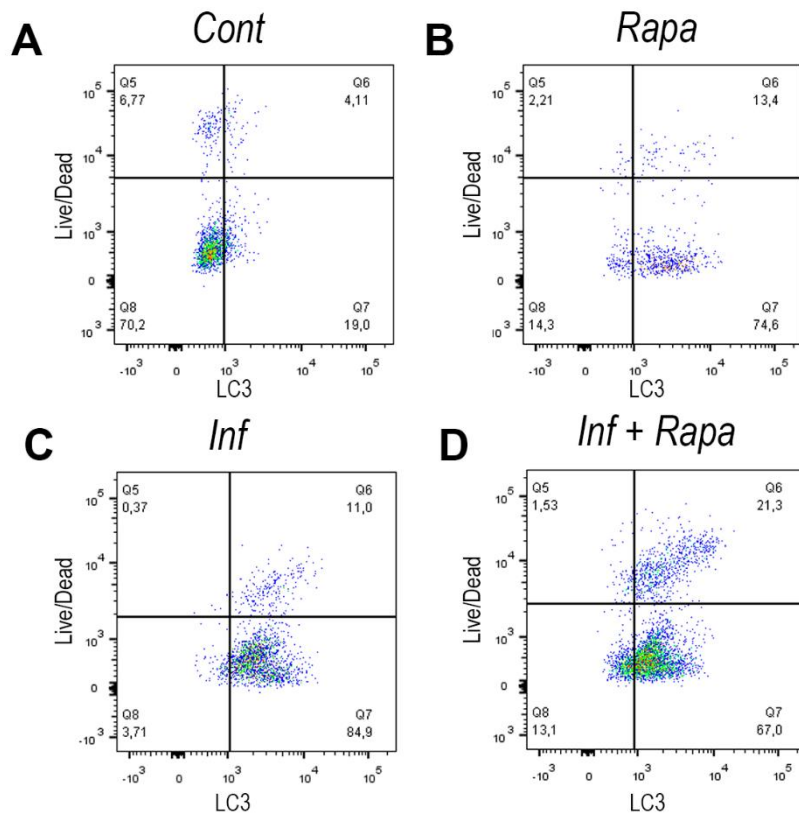


Figura 4.35 Modulação da população linfocítica do coração na infecção por *T. cruzi* e no tratamento com rapamicina. (A-D) Painéis representativos da população CD3 em LC3 e Live/Dead (n:2).

## V. DISCUSSÃO

Embora os primeiros trabalhos de autofagia datem da década de 1960, a explosão desses estudos aconteceu com a descoberta das proteínas Atg somente cerca de 30 anos depois, sendo apenas na década seguinte que esta via foi correlacionada com a infecção por patógenos (Duve, 1963; Deter et al., 1967, Ohsumi et al., 1993; Gutierrez et al., 2004). Na presente tese, avaliamos se a via autofágica estaria relacionada à infecção por *T. cruzi in vitro* e *in vivo*.

Para tal, estabelecemos primeiramente a susceptibilidade dos modelos *in vitro*, onde utilizamos dois tipos celulares importantes na infecção natural por esse parasito (M $\phi$  e CC), e se estas seriam susceptíveis à indução autofágica, seja por via farmacológica (rapamicina) ou por incubação com menos nutrientes (sem glicose e sem suplementação de SFB). Ambas condições induziram autofagia nos tempos analisados, sem induzir a morte celular (Figuras 4.1 e 4.2), corroborando dados da literatura obtidos com tipos celulares semelhantes (Maruyama et al., 2008; Williams et al., 2009; Roberts et al., 2014). Foi observado que em M $\phi$ , o estresse nutricional aumentava a quantidade de pontos de LC3 de forma tempo-dependente, enquanto em CC a expressão de LC3 decaía com o tempo. Todavia, CC submetidas a indução de autofagia (rapamicina ou depleção de nutrientes) apresentaram mais pontos de LC3 que M $\phi$  após 24 h. O uso das duas vias de indução se justifica para demonstrar que nos dois tipos celulares a ativação desta via pode ocorrer tanto por intermédio de AMPK como pela inibição direta de mTOR pelo fármaco. Níveis diferentes de expressão de LC3-II sugerem maior sensibilidade ao estresse nutricional por depleção

de glicose nessas células, enquanto os níveis de rapamicina, na concentração usada, não diferem com o tempo, inferindo limite de ativação por este fármaco.

A depleção nutricional por glicose encaminha para um remodelamento da produção de ATP, alterando o metabolismo energético celular (Maruyama et al., 2008). Optamos por este meio pois em CC foi demonstrado a associação da depleção de glicose e autofagia, via ativação de AMPK, que por sua vez ativa ULK, disparando o processo de formação do autofagossomo, além do fato de que a hexoquinase-II, bastante presente no coração, foi descrita como indutora de autofagia em situações de baixa glicose (Maruyama et al., 2008; Roberts et al., 2014). M $\phi$  também utilizam da glicose como fonte primária de energia (Oren et al., 1963), com aumento do processo glicolítico *in vitro* (Bennett et al., 1966), além de aminoácidos como serina e glutamina (Sakagami et al., 2009). Adverte-se, entretanto, que há outras condições usadas na literatura para estresse nutricional, como fatores hormonais, uso de citocinas como o IFN- $\gamma$ , depleção de aminoácidos como EBSS (tampão de estresse Earle) ou HBSS (solução salina balanceada de Hank), e até mesmo PBS enriquecido com MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl (Romano et al., 2009; Martins et al., 2011; Ramirez-Peinado et al., 2013).

Por optarmos pela co-incubação de parasitos e indutores de autofagia com as células hospedeiras, o potencial efeito tóxico da indução de autofagia nos parasitos foi avaliado inicialmente. O uso de rapamicina (22  $\mu$ M) levou à uma perda do potencial de membrana mitocondrial e danos na integridade da membrana plasmática, causando morte do parasito (Figuras 4.3 A-C).

A morte celular por autofagia já havia sido descrita em diferentes formas de *T. cruzi* (Braga et al., 2005; Santa-Rita et al., 2005; Menna-Barreto et al., 2007, 2009; Fernandes et al., 2012; Veiga-Santos et al., 2012,2014; Fonseca-Berzal, et al., 2016; Lazarin-Bidóia et al., 2016), entretanto, o efeito de rapamicina, um inibidor de mTORC1, ainda não havia sido relatado no *T. cruzi*, apesar de ter sido descrita sua possível atuação sobre TORC2 por reconstrução *in silico* (Digirolamo et al., 2012). Em *T. brucei*, demonstrou-se alterações na bolsa flagelar, citocinese e polarização celular com 24h de tratamento com rapamicina, decorrentes da inativação de TORC2 (Barquilla et al., 2008), enquanto em TOR1 indica papel na osmorregulação (de Jesus et al., 2010). A similaridade das sequências de TOR entre *T. cruzi* e *T. brucei* sugere que a ação da rapamicina siga mecanismo semelhante no agente da doença de Chagas, todavia experimentos precisam ser realizados para confirmar esta hipótese.

Por conta deste efeito deletério no parasito, o tratamento com a rapamicina foi descartado, e o meio de estresse nutricional selecionado como modelo de indução autofágica nos ensaios subsequentes, uma vez que a viabilidade dos parasitos não afetou a infecção das células (Figuras 4.3 D, E). É interessante observar que parasitos respondem ao tratamento com diferentes inibidores associados a modulação da interação como inibidores de PKC, quelantes de  $Ca^{2+}$  intracelular e até mesmo inibidor de PI3K (wortmanina), via esta associada a inibição de autofagia. Maeda e colaboradores (2012) avaliaram que o tratamento com wortmanina de tripomastigotas metacíclicos (cepas G e CL), reduz a invasão em células HeLa. Nossos resultados reforçam que a modulação pelo estresse nutricional não afeta o

parasito e a possível modulação na infecção depende da resposta da célula hospedeira, não do patógeno.

Após a avaliação da célula hospedeira e parasito separadamente, ensaios de interação células hospedeiras e tripomastigotas foram realizados para verificar a participação da autofagia no processo (Figura 4.4). Nossos dados corroboram que há um aumento do número de pontos de LC3 na infecção por *T. cruzi* (Romano et al., 2009; Onizuka et al., 2017), em semelhança ao que ocorre com outros protozoários como *T. gondii* e *L. amazonensis* (Wang et al., 2009; Cyrino et al., 2012; Souto et al., 2016). Quando comparamos os tempos de 24h de infecção de CC e M $\phi$ , observa-se que há um número maior de pontos LC3 em CC infectadas (Figuras 4.4 C, D), sugerindo que esse tipo celular infectado é mais susceptível ao aumento de LC3 que M $\phi$  na mesma situação, já que ambas as culturas sem infecção não apresentam diferença.

De modo interessante, o aumento de LC3 ocorre na cultura infectada, e não está associada diretamente a internalização do parasito em CC (Figuras 4.4D, F). Todavia, em M $\phi$ s infectados há um maior número de pontos de LC3 do que em células não infectadas (Figura 4.4E), sugerindo a participação de LC3 na infecção do parasito em M $\phi$ , enquanto em CC o aumento decorre da presença do parasito na cultura.

Optou-se pela co-incubação no desenho experimental devido ao longo tempo de avaliação do processo (até 48h de incubação com o meio de estresse nutricional), objetivando a manutenção do processo autofágico nas células hospedeiras sem que houvesse morte celular. Esse protocolo é distinto do usado em outros trabalhos, principalmente pelo curto tempo de interação que esses avaliam (Romano et al., 2009;

Martins et al., 2011; Maeda et al., 2012; Cortez et al., 2016; Clemente et al., 2016) ou pela incubação curta com o estresse e avaliação tardia da infecção (Pinheiro et al., 2009; Romano et al., 2009).

Dessa forma, o estresse nutricional junto à infecção exacerba a autofagia em M $\phi$  nos dois tempos estudados (Figuras 4.5D, E). Quando se compara M $\phi$  sob estresse nutricional sem e com infecção, observa-se um aumento de 3x nos pontos de LC3 em células infectado após 6 h em relação a não infectada no mesmo tempo (Figuras 4.2D e 4.5D). Já em CC (24 h), ocorre o inverso: o aumento de pontos LC3 é maior na cultura não infectada que na infectada, submetidas a depleção de nutrientes (Figuras 4.2E e 4.5E), mostrando que não há um efeito aditivo com relação a expressão de LC3-II. Nas imagens, observa-se íntimo contato do parasito com pontos de LC3 nos tempos analisados tanto para células controle como para células sob estresse nutricional (Figura 4.5A), contudo não foi observado, uma associação maior de LC3-II e parasito quando há a indução autofágica por depleção de glicose (dados não mostrados). Romano e colaboradores (2009) também observam co-localização de LC3 ao parasito (tanto ameba como tripomastigota), independente do estresse nutricional ou com o uso da rapamicina, reforçando a hipótese de associação da autofagia à internalização e também ao ciclo intracelular do parasito.

Visando avaliar se a indução autofágica prévia modularia a entrada e o ciclo do parasito no interior da célula hospedeira (Figura 4.6), como demonstrado durante a infecção de macrófagos por *L. amazonensis* (Pinheiro et al., 2009; Cyrino et al., 2012) e *L. major* (Franco et al., 2017), ou ainda na infecção de células HeLa com tripomastigotas metacíclicos (Martins et al., 2011), realizou-se a depleção nutricional

antes da infecção. Nosso trabalho verificou uma diminuição da infecção de M $\phi$  e do número de parasitos/célula infectada e em CC, esta diminuição foi observada apenas no tempo mais tardio (48h) (Figura 4.6). Em contrapartida, Romano e colaboradores (2009) verificaram que a infecção por TCTs (cepas CL Brener e RA) aumenta com a indução autofágica em células CHO, na razão de 50 parasitos por célula, enquanto o grupo de Yoshida (Martins et al., 2011; Cortez et al., 2016) observaram que células HeLa submetidas ao estresse nutricional e infectadas com TCT (cepa CL ou G na razão 20:1) também aumentam a quantidade de parasitos internalizados em tempos curtos (até 2h de interação). Nossos resultados, contudo, indicam o oposto ao observado por estes autores em M $\phi$ , sem observar influência da depleção nutricional em CC (Figura 4.8).

Para avaliar se a infecção seria modulada com a indução autofágica após a interação, a incubação com meio de estresse nutricional em dois momentos – logo após a internalização, analisando o período de diferenciação do tripomastigota em amastigota e após a diferenciação em amastigota, analisando a proliferação do parasito foi analisada (Figura 4.7). Enquanto M $\phi$  não apresentaram alterações nos parâmetros infecção e parasito/célula hospedeira, assim como observado em células CHO (Romano et al., 2009), o estresse autofágico reduziu a infecção e a quantidade de parasitos/célula em CC (Figuras 4.7B, D), sugerindo uma diminuição da proliferação dos parasitos, o que decairia a infecção. Resultados semelhantes demonstrando uma redução do número de parasitos/célula infectada em células sob indução autofágica posterior à infecção foram observados no modelo de *L. major* (Franco et al., 2017), indicando também um bloqueio de proliferação nesse parasito



como ocorreu com o *T. cruzi* em nosso modelo. Esta redução da infecção de CC sugere mecanismos distintos de ação da autofagia nos dois tipos celulares utilizados na presente tese: a interferência da autofagia na infecção em CC parece ser após a entrada do tripomastigota.

Uma possível justificativa para alterações na resposta das células utilizadas poderia estar associada ao perfil fagocítico delas. Diversos autores mostraram uma conversão das vias autofágica e endocítica, indicando que a menor expressão de receptores na superfície de macrófagos reduz também LC3-II (Shui et al., 2008; Bonilla et al., 2013), além de mostrar uma redução da fagocitose quando há indução autofágica (Lima et al., 2011; Paschoal et al., 2017). Mais recentemente, Franco e colaboradores (2017) mostraram que a autofagia presente na infecção de macrófagos por *L. major* é dependente de TLR3/7/9, indicando a participação desses receptores de endossomo na autofagia.

Desse modo, verificamos se o mesmo ocorria no nosso modelo através de dois ensaios: aumentando a razão de parasitos em menor tempo, e verificando a internalização (Figura 4.8); ou colocando parasitos mortos e partículas inertes (Figura 4.9 e 4.10). CC sob o estresse nutricional não respondem ao aumento de parasitos nem a adição de partículas de Zymosan ou parasitos mortos, assim como células MEF (Figura 4.12). Já a internalização de tripomastigotas e a fagocitose de partículas ou parasitos mortos em M $\phi$  sob indução autofágica são reduzidas, possivelmente devido a participação de TLRs - TLR2 (receptor já descrito tanto na infecção por *T. cruzi* como ligante de Zymosan) ou TLR4 (também relatado para LPS), sem necessariamente ter a participação da proteína adaptadora MyD88, como também demonstrado por outros

autores (Waltz et al., 2011; Shi et al., 2016; Franco et al., 2017; revisto em Delgado et al., 2008). A exceção de regulação negativa da fagocitose foi o tempo de 24h, no qual consideramos que há uma eliminação mais lenta das partículas de Zymosan e parasitos mortos.

Para confirmar se a autofagia está interferindo com a infecção, o silenciamento do gene *ATG5* foi realizado em células que superexpressavam LC3-GFP (Figura 4.11). Desta forma, foi confirmada a redução da infecção em células sob estresse nutricional, assim como foi observado em CC (Figura 4.11). O silenciamento do gene autofágico levou ao aumento da infecção, sem interferir na proliferação do parasito em 24h. Contudo, Romano e colaboradores (2009) mostraram que a célula nocaute para *ATG5* apresenta menor infecção em 1 e 72h, com razão de 50 TCT por célula.

Martins e colaboradores (2011) e Cortez e colaboradores (2016), colocam como uma das justificativas para resultados distintos de infecção a forma tripomastigota usada. Formas metacíclicas expressam na sua superfície gp 82, que leva ao recrutamento de componentes da célula hospedeira, incluindo a mobilização de lisossomos na superfície celular e proteínas associadas a mTOR. Embora as TCTs sejam utilizadas como um modelo para mimetizar o parasito no hospedeiro vertebrado (Yoshida, 2006), já foi demonstrado que as formas TCTs e tripomastigotas sanguíneos infectam células Vero diferentemente (Toma et al., 2000). Além disso, dados do nosso grupo por análise proteômica demonstram que os tripomastigotas sanguíneos possuem moléculas adsorvidas do hospedeiro em sua superfície, além de expressar outras distintas da encontrada no vetor (Brunoro et al., 2015) e também vesículas

membranares na sua superfície que interferem na infecção (Lantos et al., 2016). Somado a isso, San Francisco e colaboradores (2017) demonstrou, usando a mesma cepa e forma tripomastigota (TCT), porém distintas passagens (uma mantida em camundongo e a outra, em meio axênico e cultura de células), que a expressão de gp85/transialidases difere e impacta na virulência e infecção. Indica-se assim que os dados aqui apresentados são diferentes dos encontrados por outros autores por utilizar-se de cepa distinta e tripomastigotas sanguíneos e também TCTs que foram coletados de culturas infectadas por tripomastigotas sanguíneos, sem diferença de infectividade e virulência [como relatado por San Francisco e colaboradores (2017)]. Destaca-se mais uma vez, a importância do uso de células de cultura primária, que nem sempre tem o perfil semelhante ao de células de linhagem, como também a infectividade de tripomastigotas de cultura e sanguíneo, assim como a cepa usada.

Esses resultados corroboram a hipótese de que a autofagia interfere no ciclo intracelular do parasito, diminuindo a infecção em decorrência da menor internalização em células fagocíticas (M $\phi$ ), bem como bloqueando e/ou inibindo a proliferação, além de degradando os parasitos em células não fagocíticas profissionais (fibroblastos e CC). A autofagia parece mobilizar componentes para homeostase celular, prevenindo a infecção e persistência do parasito.

Sabendo da participação da autofagia na infecção por *T. cruzi* em CC e M $\phi$  *in vitro*, verificamos se há também a participação da autofagia na infecção experimental aguda. Para isso, avaliamos primeiramente se há autofagia na infecção, analisando em paralelo a diferença de inóculo nos camundongos (Figura 4.13 - 4.16). Usamos dois inóculos para verificar se a diferença de infiltrado inflamatório e parasitemia,

anteriormente avaliada por diferentes grupos influenciaria nos níveis de autofagia e modulação desse processo no hospedeiro (Vieira et al., 2012; Borges et al., 2013). As diferenças de parasitemia e infiltrados inflamatórios, bem como expressão de LC3-II no coração não foram significativas (Figura 4.17). A opção por realizar as demais avaliações de infecção e modulação da resposta à autofagia usando como inóculo  $10^3$  tripomastigotas por animal foi justificado pela maior mortalidade observada no outro inóculo (Figura 4.13).

Como a maior marcação de LC3-II no tecido cardíaco infectado foi observado em regiões com maior vascularização, fibrose e endotélio, uma possível justificativa é que o remodelamento cardíaco decorrente da infecção eleva os níveis de autofagia nessas células. Diversas patologias cardíacas demonstram que a presença de alterações no tecido conectivo está associada ao aumento da expressão de LC3-II, indicando aumento do processo autofágico (Deroyer et al., 2015; revisto em Nishida et al., 2009).

Se a autofagia está maior em animais infectados, de que forma exacerbar o processo contribui para a miocardite e o desenvolvimento da infecção no modelo murino? Incluímos no modelo a indução da autofagia por rapamicina, sendo inicialmente padronizados a concentração, o tempo e o momento de tratamento. Diferentes tempos e concentrações de rapamicina já foram testadas na literatura, porém não há um consenso quanto ao tratamento em cardiopatias (Shioi et al., 2003; Khan et al., 2006; Wang et al., 2013) e, mesmo sendo utilizado para transplante renal e do miocárdio, assim como para rejeição vasculopática, seu uso pode ser benéfico ou prejudicial dependendo do tempo e concentração (Keogh et al., 2004; Gross,

2006). O tratamento com rapamicina por 10 dias, independente da concentração levou ao prolongamento do intervalo PR no ECG, que decorreu o BAV. Diferentes fármacos apresentam este mesmo efeito adverso (Nada et al., 2013), como os antiarrítmicos quinidina, verapamil (Tanowitz et al., 1996; Chandra et al., 2002) e amiodarona (Benaim & Mondolffi, 2012), também usados na clínica, inclusive em pacientes com cardiopatia chagásica. Assim como esses fármacos, a descontinuação do uso da rapamicina (dia 17, Figura 4.17D) também levou a redução do intervalo PR. Não são descritas até o momento alterações elétricas provocadas por esta droga, apenas redução do tamanho do órgão em casos de transplantes (Kushwaha et al., 2008), hipertrofia (Shioi et al., 2003) e disfunções cardíacas associadas ao envelhecimento (Flynn et al., 2013). Sabe-se que a rapamicina se liga a proteína FKBP12 e que a formação desse complexo inibe outro complexo, a mTORC1 e, além disso esse grupo de proteínas é também associado a receptores de rianodina – uma classe de canais de  $Ca^{2+}$  intracelular em retículo sarcoplasmático no tecido miocárdico (Kaftan et al., 1996; Fauconnier et al., 2005 a,b), aliada ao bloqueio dos canais de  $K^{+}$  (DuBell et al., 2000) e  $Na^{+}$  (Maruyama et al., 2011), avaliados *in vitro*. Sugerimos, dessa forma, que a rapamicina em camundongos não-infectados altera o intervalo PR, decorrendo o BAV, através da alteração dos potenciais elétricos dos cardiomiócitos mediado pela ligação aos canais de  $Ca^{2+}$ ,  $K^{+}$  e  $Na^{+}$ , principalmente.

Ainda com as alterações temporárias no intervalo PR, o tratamento com rapamicina não levou a danos renais, cardíacos ou hepáticos, e optamos assim por colocar a maior concentração testada, de 1 mg/kg/dia, que não ultrapassa os valores

máximos de concentração usada em humanos entre 5 e 15 mg/dia (alcançando até um ano de tratamento para evitar rejeição de transplantes).

Sabendo da indução autofágica da rapamicina, realizou-se o tratamento dos animais infectados para avaliar se a resposta frente à infecção seria modulada como fora observada *in vitro*. A opção de tratar a partir do dpi 5 foi justificada pelo período que inicia a positividade da parasitemia, sendo observados parasitos circulantes, inclusive no peritônio, local do tratamento. Ainda que a atividade tripanocida tenha sido observada *in vitro*, a rapamicina não teve o mesmo efeito no modelo *in vivo*, não modulando a parasitemia ou o número de ninhos de amastigotas no coração, justificado pela biodisponibilidade do fármaco no hospedeiro.

A exacerbação da autofagia em células hospedeiras com contato com o parasito era esperado, como demonstrado pelos dados *in vitro* (Figura 4.4). Esses percentuais elevados com a infecção foram observados em todos os órgãos analisados, corroborando os nossos dados, que indicam a infecção como fator para indução autofágica.

A avaliação do peritônio foi importante para verificar se o tratamento com rapamicina induziriam autofagia nas células diretamente, e se estas células estariam em processo de morte celular. A população de macrófagos apresenta maior expressão de LC3 que as células linfocíticas (Tabela 4.1). A atividade fagocítica de macrófagos sugere que a ativação de LC3 seja superior nesse tipo celular, inclusive nos animais controle. Mais que isso, o peritônio mostrou que o tratamento de dez dias não levou a morte celular dessas células, independente da infecção.

Por outro lado, a atrofia do timo era esperada com o tratamento com rapamicina (Luo et al., 1994; Tian et al., 2004) e também na infecção por *T. cruzi* (Leite-de-Moraes et al., 1992), assim como diminuição da população DP. O tratamento com rapamicina e outros imunossuppressores parece não afetar a distribuição das populações, contudo a rapamicina junto a infecção enriqueceu a população DN em nosso modelo, indicando que há uma modulação da seleção tímica, precisando de mais ensaios para confirmar tal sugestão.

No baço, a redução do tamanho do órgão no grupo infectado + rapamicina corrobora mais uma vez o efeito imunossupressor do fármaco, como também descrito em outras patologias com esplenomegalia, que mostram a via mTOR associada a proliferação celular, angiogênese e fibrinogênese nesse tecido (Chen et al., 2016). Acredita-se que o maior tempo de tratamento reduziria ainda mais o órgão. A modulação observada nas populações CD4 e CD8 também já foram descritas em outros modelos (revisto em Powell & Delgoffe, 2010). Tal regulação, quando comparado aos animais apenas infectados, sugere que no animal infectado tratado com rapamicina a população CD4 e DN são as que levam a diminuição do baço, já que há um aumento de eventos Live/Dead<sup>+</sup> nessas células.

É descrito que o tratamento com rapamicina module células CD4<sup>+</sup> para perfis Th2 e Treg, enquanto nas células CD8<sup>+</sup> há uma regulação para a formação de células de memória. Como a infecção também regula a população de células de memória efectoras e central, avaliamos se a junção dos dois comprometeria as populações. A rapamicina associada à infecção aumentou ainda mais o percentual de células de

memória, principalmente em CD8, sugerindo que, mesmo com o efeito supressor nos linfócitos, a população que permanece será responsiva.

Diferentes grupos já mostraram que a expressão do LC3 é variável entre os tecidos e órgãos, assim como as isoformas desta proteína (Tanida et al., 2004; Zois et al., 2011). Além disso, como a dinâmica da via autofágica pode ter um fluxo rápido, autores sugerem o uso de inibidores do processo autofágico, principalmente associado ao bloqueio da fusão lisossomal para avaliação da LC3 (Klionsky et al., 2016; Pietrocola et al., 2017). Por isso, realizou-se o ensaio com a leupeptina para confirmar, não só a expressão baixa no baço como a diferença entre os grupos. Haspel e colaboradores (2011) injetaram via i.p. leupeptina e outros inibidores e avaliaram que no baço não ocorria o aumento de LC3 após 2h da injeção, em contrapartida em outros órgãos como o fígado e coração sim. Já Pietrocola e colaboradores (2017) só verificou diferença nos leucócitos submetidos a restrição calórica quando submetidos ao tratamento com leupeptina, como usado nesta tese. Verificamos respostas diferentes nos linfócitos esplênicos, sendo células não ativadas dos grupos controle e rapamicina não respondem ao aumento de LC3 com leupeptina como anteriormente visto (Haspel et al., 2011), enquanto as células ativadas dos animais infectados, com perfil efetor mostraram responsivas a leupeptina, com maior marcação de LC3, como em Pietrocola e colaboradores (2017). Nosso trabalho infere que a ativação e o perfil dos esplênocitos influencia na resposta à leupeptina e assim, no bloqueio do fluxo autofágico, verificando que as células dos animais infectados estão com maior marcação.



No coração, observou-se as maiores alterações quanto à adição de rapamicina aos animais infectados. A redução do tamanho do órgão, do dano cardíaco avaliado pela CK-MB e o menor intervalo PR no grupo infectado e tratado sugere modulações no órgão, inferindo capacidade protetora da rapamicina durante a infecção aguda. Um dos efeitos interessantes observados foi a redução do intervalo PR no camundongo infectado e tratado, com relação ao intervalo do animal apenas infectado, retomando valores encontrados com a rapamicina (Figura 4.21F). Uma das hipóteses do prolongamento do intervalo PR na infecção está associado a modulação dos canais iônicos, e era esperado um efeito aditivo, que não ocorreu. Contrariamente, uma diminuição comparada a infecção foi observada, sugerindo que a rapamicina confere às células do tecido cardíaco alterações elétricas opostas as provocadas pela infecção, balanceando o potencial elétrico, reduzindo o intervalo PR. Mesmo não alcançando os valores dos animais não infectados e tratados, a redução do intervalo PR concomitante à redução dos valores de CK-MB, próximos aos valores encontrados no grupo controle reforça a hipótese de mecanismo protetor da rapamicina na cardiopatia chagásica, assim como observada em cardiopatia associada ao diabetes ou hipertrofia (Harston et al., 2011), situações de isquemia e reperfusão cardíaca e outras miocardites idiopáticas (Bishu et al., 2013). Outros fármacos, também correlacionados a modulação autofágica mostram efeito similar como o resveratrol (Vilar-Pereira et al., 2016) e a amiodarona (Benaim & Mondolffi, 2012, Cruz et al., 2017).

Outras células imunes podem ser moduladas como os próprios macrófagos (Martinet et al., 2007). Desse modo, uma hipótese seria a modulação dos macrófagos

durante a infecção associada a rapamicina, já que recentes trabalhos têm mostrado a participação de macrófagos residentes tanto na condução cardíaca (Hulsman et al., 2017) como na ativação de arritmias na cardiopatia diabética (Monnerat et al., 2016). Não foi avaliado, nessa tese, contudo, a participação dos macrófagos cardíacos, sendo uma perspectiva para compreender tal associação.

Considera-se ainda que, diversos trabalhos mostram a rapamicina como um fármaco para longevidade (Harrison et al., 2009; Anisimov et al., 2011; Miller et al., 2011, 2014; Ramos et al., 2012; Komarova et al., 2012; Neff et al., 2013; Bitto et al., 2016), sendo que o seu papel imunossupressor sugere que o controle da inflamação favorece a sobrevivência, inclusive nas infecções.

Assim, na infecção experimental por *T. cruzi*, a autofagia está exacerbada como descrito para outras infecções. A indução de autofagia, contudo, não parece afetar na infecção em si, porém a modulação realizada principalmente em órgãos como baço e coração sugerem que a imunorregulação é um possível mecanismo de terapêutica, que pode ser associado ao tratamento com o benzonidazol. Nossos dados corroboram o papel cardioprotetor da rapamicina na miocardite chagásica aguda.

## VI. CONCLUSÕES

- A infecção por *Trypanosoma cruzi* induz autofagia nas células hospedeiras *in vitro* e *in vivo*
- A autofagia de células cardíacas e macrófagos é induzida pela infecção por *T. cruzi*, estando associada principalmente a presença do parasito na célula hospedeira;
- A indução autofágica diminui a infecção de duas formas, a depender do tipo celular infectado. Em células fagocíticas, diminui a internalização do parasito, reduzindo também a fagocitose de partículas inertes e parasitos mortos. Em células não fagocíticas, reduzindo a proliferação ou bloqueando a diferenciação do *T. cruzi*. O uso de células nocaute de gene ATG5 da via autofágica impede a modulação pelo estresse nutricional, aumentando a infecção;
- A autofagia também é induzida durante a miocardite chagásica aguda, independente do inóculo, tanto no coração como em órgãos modulados pela infecção como timo e baço. O tratamento com rapamicina leva a redução do tamanho do baço associada a alteração do perfil de células memória e indução de morte celular; no coração, o tratamento induz alterações elétricas induzindo o bloqueio átrio-ventricular (reversível caso interrompa o tratamento), além de reduzir os níveis de CK-MB e infiltrado inflamatório. Entretanto a rapamicina não é capaz de reduzir a parasitemia.

## VII. REFERÊNCIAS

- Abad-Franch F, Monteiro FA. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:57-70.
- Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*. IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*. 1996;84(2):231-44.
- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis*. 2010;201(9):1308-15.
- Albajar-Vinas P, Jannin J. The hidden Chagas disease burden in Europe. *Euro Surveill*. 2011;16(38).
- Albareda MC, De Rissio AM, Tomas G, Serjan A, Alvarez MG, Viotti R, et al. Polyfunctional T cell responses in children in early stages of chronic *Trypanosoma cruzi* infection contrast with monofunctional responses of long-term infected adults. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(12):e2575.
- Albareda MC, De Rissio AM, Tomas G, Serjan A, Alvarez MG, Viotti R, et al. Polyfunctional T cell responses in children in early stages of chronic *Trypanosoma cruzi* infection contrast with monofunctional responses of long-term infected adults. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(12):e2575.
- Albertti LA, Macedo AM, Chiari E, Andrews NW, Andrade LO. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes Infect*. 2010;12(10):784-9.
- Altclas JD, Barcan L, Nagel C, Lattes R, Riarte A. Organ transplantation and Chagas disease. *JAMA*. 2008;299(10):1134; author reply -5.
- Alvarez VE, Kosec G, Sant Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B. Blocking autophagy to prevent parasite differentiation: a possible new strategy for fighting parasitic infections? *Autophagy*. 2008;4(3):361-3.
- Alvarez VE, Kosec G, Sant'Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 2008;283(6):3454-64.

Alves MJ, Mortara RA. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104 Suppl 1:76-88.

Andrade JP, Marin Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, et al. I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. Arq Bras Cardiol. 2011;96(6):434-42.

Andrade LO, Andrews NW. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. J Exp Med. 2004;200(9):1135-43.

Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. Nat Rev Microbiol. 2005;3(10):819-23.

Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels MJ, Striepen B, Subauste CS. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. J Clin Invest. 2006;116(9):2366-77.

Andres AM, Hernandez G, Lee P, Huang C, Ratliff EP, Sin J, et al. Mitophagy is required for acute cardioprotection by simvastatin. Antioxid Redox Signal. 2014;21(14):1960-73.

Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am J Trop Med Hyg. 1999;60(5):726-32.

Anisimov VN, Zabezhinski MA, Popovich IG, Piskunova TS, Semenchenko AV, Tyndyk ML, et al. Rapamycin increases lifespan and inhibits spontaneous tumorigenesis in inbred female mice. Cell Cycle. 2011;10(24):4230-6.

Araújo-Jorge TC, Sampaio EP, De Souza W, Meirelles MeN. *Trypanosoma cruzi*: the effect of variations in experimental conditions on the levels of macrophage infection in vitro. Parasitol Res. 1989;75(4):257-63.

Báfica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 2006;177(6):3515-9.

Baida RC, Santos MR, Carmo MS, Yoshida N, Ferreira D, Ferreira AT, et al. Molecular characterization of serine-, alanine-, and proline-rich proteins of *Trypanosoma cruzi* and their possible role in host cell infection. Infect Immun. 2006;74(3):1537-46.

Ballou LM, Lin RZ. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. J Chem Biol. 2008;1(1-4):27-36.

Barbosa HS, Meirelles MN. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Struct Funct*. 1995;20(4):275-84.

Barquilla A, Crespo JL, Navarro M. Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(38):14579-84.

Barrias ES, de Carvalho TM, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*. Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Front Immunol*. 2013;4:186.

Barrias ES, Reignault LC, De Souza W, Carvalho TM. Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. *PLoS One*. 2010;5(1):e7764.

Barrias ES, Reignault LC, De Souza W, Carvalho TM. *Trypanosoma cruzi* uses macropinocytosis as an additional entry pathway into mammalian host cell. *Microbes Infect*. 2012.

Batista DG, Silva CF, Mota RA, Costa LC, Meirelles MN, Meuser-Batista M, et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the expression of Rabs and alters the endocytosis in mouse cardiomyocytes in vitro. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(6):605-14.

Bejarano E, Girao H, Yuste A, Patel B, Marques C, Spray DC, et al. Autophagy modulates dynamics of connexins at the plasma membrane in a ubiquitin-dependent manner. *Mol Biol Cell*. 2012;23(11):2156-69.

Benaim G, Paniz Mondolfi AE. The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. *Nat Rev Cardiol*. 2012;9(10):605-9.

Bennett B. Isolation and cultivation in vitro of macrophages from various sources in the mouse. *Am J Pathol*. 1966;48(1):165-81.

Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(4):655-81.

Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis*. 2009;49(5):e52-4.

Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Aché A, Lacouture S, et al. Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote excreted-secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains. *Transfus Med*. 2006;16(6):419-31.

Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Aché A, Lacouture S, et al. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):291-6.

Bestetti RB, Muccillo G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 1997;60(2):187-93.

Bishu K, Ogut O, Kushwaha S, Mohammed SF, Ohtani T, Xu X, et al. Anti-remodeling effects of rapamycin in experimental heart failure: dose response and interaction with angiotensin receptor blockade. *PLoS One.* 2013;8(12):e81325.

Bitto A, Ito TK, Pineda VV, LeTexier NJ, Huang HZ, Sutlief E, et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *Elife.* 2016;5.

Blanchet D, Brenière SF, Schijman AG, Bisio M, Simon S, Véron V, et al. First report of a family outbreak of Chagas disease in French Guiana and posttreatment follow-up. *Infect Genet Evol.* 2014;28:245-50.

Blum JA, Zellweger MJ, Burri C, Hatz C. Cardiac involvement in African and American trypanosomiasis. *Lancet Infect Dis.* 2008;8(10):631-41.

Bonilla DL, Bhattacharya A, Sha Y, Xu Y, Xiang Q, Kan A, et al. Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. *Immunity.* 2013;39(3):537-47.

Bonney KM, Taylor JM, Daniels MD, Epting CL, Engman DM. Heat-killed *Trypanosoma cruzi* induces acute cardiac damage and polyantigenic autoimmunity. *PLoS One.* 2011;6(1):e14571.

Borges DC, Araújo NM, Cardoso CR, Lazo Chica JE. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology.* 2013;138(2):145-56.

Botbol Y, Guerrero-Ros I, Macian F. Key roles of autophagy in regulating T-cell function. *Eur J Immunol.* 2016;46(6):1326-34.

Braga MV, de Souza W. Effects of protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;256(2):209-16.

Braga MV, Magaraci F, Lorente SO, Gilbert I, de Souza W. Effects of inhibitors of Delta24(25)-sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal.* 2005;11(6):506-15.

Braga MV, Magaraci F, Lorente SO, Gilbert I, de Souza W. Effects of inhibitors of Delta24(25)-sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal*. 2005;11(6):506-15.

Bray K, Mathew R, Lau A, Kamphorst JJ, Fan J, Chen J, et al. Autophagy suppresses RIP kinase-dependent necrosis enabling survival to mTOR inhibition. *PLoS One*. 2012;7(7):e41831.

BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1962;4:389-96.

Britto C, Cardoso MA, Marques P, Fernandes O, Morel CM. Polymerase chain reaction detection: new insights into the diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:305-6.

Bronietzki AW, Schuster M, Schmitz I. Autophagy in T-cell development, activation and differentiation. *Immunol Cell Biol*. 2015;93(1):25-34.

Brunoro GV, Caminha MA, Ferreira AT, Leprevost FaV, Carvalho PC, Perales J, et al. Reevaluating the *Trypanosoma cruzi* proteomic map: The shotgun description of bloodstream trypomastigotes. *J Proteomics*. 2015;115:58-65.

Burleigh BA. Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? *Sci STKE*. 2005;2005(293):pe36.

Campos JD, Hoppe LY, Duque TLA, de Castro SL, Oliveira GM. Use of Noninvasive Parameters to Evaluate Swiss Webster Mice During *Trypanosoma cruzi* Experimental Acute Infection. *J Parasitol*. 2016;102(2):280-5.

Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):363-8.

Cascabulho CM, Bani Corrêa C, Cotta-de-Almeida V, Henriques-Pons A. Defective T-lymphocyte migration to muscles in dystrophin-deficient mice. *Am J Pathol*. 2012;181(2):593-604.

Castro E. Chagas' disease: lessons from routine donation testing. *Transfus Med*. 2009;19(1):16-23.

Cavallini G, Donati A, Gori Z, Bergamini E. Towards an understanding of the anti-aging mechanism of caloric restriction. *Curr Aging Sci*. 2008;1(1):4-9.

Cerny N, Sánchez Alberti A, Bivona AE, De Marzi MC, Frank FM, Cazorla SI, et al. Coadministration of cruzipain and GM-CSF DNAs, a new immunotherapeutic vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(2):438-50.



Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909;159-218.

Chandra M, Shirani J, Shtutin V, Weiss LM, Factor SM, Petkova SB, et al. Cardioprotective effects of verapamil on myocardial structure and function in a murine model of chronic *Trypanosoma cruzi* infection (Brazil Strain): an echocardiographic study. Int J Parasitol. 2002;32(2):207-15.

Chen Y, Wang W, Wang H, Li Y, Shi M, Li H, et al. Rapamycin Attenuates Splenomegaly in both Intrahepatic and Prehepatic Portal Hypertensive Rats by Blocking mTOR Signaling Pathway. PLoS One. 2016;11(1):e0141159.

Clemente TM, Cortez C, Novaes AaS, Yoshida N. Surface Molecules Released by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms Downregulate Host Cell Invasion. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(8):e0004883.

Cooley G, Etheridge RD, Boehlke C, Bundy B, Weatherly DB, Minning T, et al. High throughput selection of effective serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(10):e316.

Cortez C, Real F, Yoshida N. Lysosome biogenesis/scattering increases host cell susceptibility to invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms and resistance to tissue culture trypomastigotes. Cell Microbiol. 2016;18(5):748-60.

Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(3):277-82.

Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104 Suppl 1:31-40.

Coura JR, Junqueira AC, Giordano CM, Funatsu RK. Chagas' disease in the Brazilian Amazon. I--A short review. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1994;36(4):363-8.

Crauwels P, Bohn R, Thomas M, Gottwalt S, Jäckel F, Krämer S, et al. Apoptotic-like *Leishmania* exploit the host's autophagy machinery to reduce T-cell-mediated parasite elimination. Autophagy. 2015;11(2):285-97.

Cruz JS, Machado FS, Ropert C, Roman-Campos D. Molecular mechanisms of cardiac electromechanical remodeling during Chagas disease: Role of TNF and TGF- $\beta$ . Trends Cardiovasc Med. 2017;27(2):81-91.

Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. Trends Endocrinol Metab. 2010;21(3):142-50.

Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:683230.

Cyrino LT, Araújo AP, Joazeiro PP, Vicente CP, Giorgio S. In vivo and in vitro *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages. *Tissue Cell.* 2012.

de Duve C. The lysosome. *Sci Am.* 1963;208:64-72.

de Jesus TC, Tonelli RR, Nardelli SC, da Silva Augusto L, Motta MC, Girard-Dias W, et al. Target of rapamycin (TOR)-like 1 kinase is involved in the control of polyphosphate levels and acidocalcisome maintenance in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 2010;285(31):24131-40.

de Oliveira GM, Diniz RL, Batista W, Batista MM, Bani Correa C, de Araújo-Jorge TC, et al. Fas ligand-dependent inflammatory regulation in acute myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol.* 2007;171(1):79-86.

de Oliveira GM. Reducing the number of mice used to obtain infective forms of *Trypanosoma cruzi* by immunosuppression with cyclophosphamide RESBCAL. 2012;1(1):92-6.

de Rezende JM, Moreira H. Chagasic megaesophagus and megacolon. Historical review and present concepts. *Arq Gastroenterol.* 1988;25 Spec No:32-43.

De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2009:89-100.

Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* 2008;27(7):1110-21.

Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe.* 2009;5(6):527-49.

Deroyer C, Magne J, Moonen M, Le Goff C, Dupont L, Hulin A, et al. New biomarkers for primary mitral regurgitation. *Clin Proteomics.* 2015;12:25.

Deter RL, Baudhuin P, De Duve C. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J Cell Biol.* 1967;35(2):C11-6.

Dias JC, Amato Neto V, Luna EJ. [Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(3):375-9.

Dias JC, Ramos AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. [Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015]. *Epidemiol Serv Saude.* 2016;25(spe):7-86.

Dias-Lima AG, Sherlock IA. Sylvatic vectors invading houses and the risk of emergence of cases of Chagas disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(5):611-3.

Dice JF, Terlecky SR, Chiang HL, Olson TS, Isenman LD, Short-Russell SR, et al. A selective pathway for degradation of cytosolic proteins by lysosomes. *Semin Cell Biol*. 1990;1(6):449-55.

Digirolamo FA, Miranda MR, Bouvier LA, Cámara MM, Cánepa GE, Pereira CA. [The mammalian TOR pathway is present in *Trypanosoma cruzi*. In silico reconstruction and possible functions]. *Medicina (B Aires)*. 2012;72(3):221-6.

Docampo R, Ulrich P, Moreno SN. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010;365(1541):775-84.

initiative DfND. FDNDi Chagas Disease Fact Sheet <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/> 2017 [Available from: <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>].

DuBell WH, Lederer WJ, Rogers TB. K(+) currents responsible for repolarization in mouse ventricle and their modulation by FK-506 and rapamycin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(3):H886-97.

Dubner S, Schapachnik E, Riera AR, Valero E. Chagas disease: state-of-the-art of diagnosis and management. *Cardiol J*. 2008;15(6):493-504.

Duque TLA, Souto XM, Andrade-Neto VVd, Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RFS. Autophagic Balance Between Mammals and Protozoa: A Molecular, Biochemical and Morphological Review of Apicomplexa and Trypanosomatidae Infections. In: Bailly Y, editor. *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* Rijeka, Croatia: Intech; 2013. p. 30.

Dutra WO, Martins-Filho OA, Cançado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Freeman Júnior GL, et al. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol*. 1994;6(4):499-506.

Dutra WO, Martins-Filho OA, Cançado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Gazzinelli G, et al. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 1996;43(1):88-93.

Dutra WO, Menezes CA, Magalhães LM, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol*. 2014;36(8):377-87.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005;309(5733):409-15.

Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(4):664-73.

Esper L, Talvani A, Pimentel P, Teixeira MM, Machado FS. Molecular mechanisms of myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28(3):246-52.

Fabbro D, Velazquez E, Bizai ML, Denner S, Olivera V, Arias E, et al. Evaluation of the ELISA-F29 test as an early marker of therapeutic efficacy in adults with chronic Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(3).

Fabbro D, Velazquez E, Bizai ML, Denner S, Olivera V, Arias E, et al. Evaluation of the ELISA-F29 test as an early marker of therapeutic efficacy in adults with chronic Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(3).

Fauconnier J, Lacampagne A, Rauzier JM, Fontanaud P, Frapier JM, Sejersted OM, et al. Frequency-dependent and proarrhythmogenic effects of FK-506 in rat ventricular cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(2):H778-86.

Fauconnier J, Lacampagne A, Rauzier JM, Vassort G, Richard S. Ca<sup>2+</sup>-dependent reduction of IK1 in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure? *Cardiovasc Res*. 2005;68(2):204-12.

Fernandes MC, Andrade LR, Andrews NW, Mortara RA. *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce cytoskeleton modifications during HeLa cell invasion. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(8):1014-6.

Fernandes MC, Cortez M, Geraldo Yoneyama KA, Straus AH, Yoshida N, Mortara RA. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *Int J Parasitol*. 2007;37(13):1431-41.

Fernandes MC, Da Silva EN, Pinto AV, De Castro SL, Menna-Barreto RF. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2012;139(1):26-36.

Fernández-Villegas A, Pinazo MJ, Marañón C, Thomas MC, Posada E, Carrilero B, et al. Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers. *BMC Infect Dis*. 2011;11:206.

Ferreira D, Cortez M, Atayde VD, Yoshida N. Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. *Infect Immun*. 2006;74(10):5522-8.

Flynn JM, O'Leary MN, Zambataro CA, Academia EC, Presley MP, Garrett BJ, et al. Late-life rapamycin treatment reverses age-related heart dysfunction. *Aging Cell*. 2013;12(5):851-62.

Fonseca-Berzal C, DA Silva CF, Menna-Barreto RF, Batista MM, Escario JA, Arán VJ, et al. Biological approaches to characterize the mode of action of two 5-nitroindazolinone prototypes on *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigotes. *Parasitology*. 2016;143(11):1469-78.

Fragata-Filho AA, França FF, Fragata CaS, Lourenço AM, Faccini CC, Costa CA. Evaluation of Parasiticide Treatment with Benznidazol in the Electrocardiographic, Clinical, and Serological Evolution of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004508.

Franco LH, Fleuri AKA, Pellison NAC, Quirino GFS, Horta CV, Carvalho RVH, et al. Autophagy downstream of endosomal Toll-like Receptors Signaling in Macrophages is a Key Mechanism for Resistance to *Leishmania major* Infection. *J Biol Chem*. 2017.

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*. 2010;115(1-2):22-7.

Gebrekrstos HT, Buekens P. Mother-to-Child Transmission of *Trypanosoma cruzi*. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014;3 Suppl 1:S36-40.

Goes GR, Rocha PS, Diniz AR, Aguiar PH, Machado CR, Vieira LQ. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004555.

Granjon E, Dichtel-Danjoy ML, Saba E, Sabino E, Campos de Oliveira L, Zrein M. Development of a Novel Multiplex Immunoassay Multi-cruzi for the Serological Confirmation of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004596.

Green DR, Oguin TH, Martinez J. The clearance of dying cells: table for two. *Cell Death Differ*. 2016;23(6):915-26.

Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(2):H827-34.

Guhl F. Chagas disease in Andean countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:29-38.

Gupta S, Garg NJ. A Two-Component DNA-Prime/Protein-Boost Vaccination Strategy for Eliciting Long-Term, Protective T Cell Immunity against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*. 2015;11(5):e1004828.

Gürtler RE. Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl 1:52-9.

Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*. 2004;119(6):753-66.

Gutierrez MG, Munafó DB, Berón W, Colombo MI. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 13):2687-97.

Hall BF, Webster P, Ma AK, Joiner KA, Andrews NW. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J Exp Med*. 1992;176(2):313-25.

Hall MN. mTOR-what does it do? *Transplant Proc*. 2008;40(10 Suppl):S5-8.

Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009;460(7253):392-5.

Harston RK, McKillop JC, Moschella PC, Van Laer A, Quinones LS, Baicu CF, et al. Rapamycin treatment augments both protein ubiquitination and Akt activation in pressure-overloaded rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(5):H1696-706.

Hashimoto K, Schofield CJ. Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasit Vectors*. 2012;5:45.

Hashimoto K, Yoshioka K. Review: surveillance of Chagas disease. *Adv Parasitol*. 2012;79:375-428.

Haspel J, Shaik RS, Ifedigbo E, Nakahira K, Dolinay T, Englert JA, et al. Characterization of macroautophagic flux in vivo using a leupeptin-based assay. *Autophagy*. 2011;7(6):629-42.

Henriques-Pons A. Targeting T cells to treat *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis. In: GOMES MV, editor. *Diagnosis and treatment of myocarditis*. 1. Croatia: InTech Open; 2013. p. 47-64.

Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol*. 1987;10(11):665-70.

Higuchi MeL, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res*. 2003;60(1):96-107.

Higuchi MeL, De Brito T, Martins Reis M, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*. 1993;2(2):101-6.

Higuchi MeL, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1993;423(3):157-60.

Higuchi MeL, Lopes EA, Saldanha LB, Barretto AC, Stolf NA, Bellotti G, et al. Immunopathologic studies in myocardial biopsies of patients with Chagas' disease and idiopathic cardiomyopathy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1986;28(2):87-90.

Hissa B, Andrade LeO. *Trypanosoma cruzi* uses a specific subset of host cell lysosomes for cell invasion. *Parasitol Int*. 2015;64(2):135-8.

Hissa B, Duarte JG, Kelles LF, Santos FP, del Puerto HL, Gazzinelli-Guimarães PH, et al. Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(3):e1583.

CA H, FG W. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*. 1966;212:1385-6

Hotez PJ, Bottazzi ME, Strych U. New Vaccines for the World's Poorest People. *Annu Rev Med*. 2016;67:405-17.

Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2014;121(1):22-33.

Hua Y, Zhang Y, Ceylan-Isik AF, Wold LE, Nunn JM, Ren J. Chronic Akt activation accentuates aging-induced cardiac hypertrophy and myocardial contractile dysfunction: role of autophagy. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(6):1173-91.

Huang C, Yitzhaki S, Perry CN, Liu W, Giricz Z, Mentzer RM, et al. Autophagy induced by ischemic preconditioning is essential for cardioprotection. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010;3(4):365-73.

Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, Aguirre AD, King KR, Hanley A, et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell*. 2017;169(3):510-22.e20.

Ianni BM, Mady C. [The sugarcane juice was delicious, but...]. *Arq Bras Cardiol*. 2005;85(6):379-81.

Inoue Y, Klionsky DJ. Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21(7):664-70.

Jackson Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combescure C, Chappuis F. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2010;51(10):e69-75.

Jackson Y, Pinto A, Pett S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. *Trop Med Int Health*. 2014;19(2):212-8.

Kabat AM, Harrison OJ, Riffelmacher T, Moghaddam AE, Pearson CF, Laing A, et al. The autophagy gene *Atg16l1* differentially regulates Treg and TH2 cells to control intestinal inflammation. *Elife*. 2016;5:e12444.

Kabeja Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*. 2000;19(21):5720-8.

Kaftan E, Marks AR, Ehrlich BE. Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca(2+)-release channels from cardiac muscle. *Circ Res*. 1996;78(6):990-7.

Kasai M, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Seki S, Ikeda T, et al. Autophagic compartments gain access to the MHC class II compartments in thymic epithelium. *J Immunol*. 2009;183(11):7278-85.

Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(8):461-72.

Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy. *Methods Mol Biol*. 2008;445:227-44.

Kawamura N, Sun-Wada GH, Aoyama M, Harada A, Takasuga S, Sasaki T, et al. Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. *Nat Commun*. 2012;3:1071.

Keating SM, Deng X, Fernandes F, Cunha-Neto E, Ribeiro AL, Adesina B, et al. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. *Int J Cardiol*. 2015;199:451-9.

Keenan M, Chaplin JH. A new era for Chagas disease drug discovery? *Prog Med Chem*. 2015;54:185-230.



Keesen TS, Gomes JA, Fares RC, de Araújo FF, Ferreira KS, Chaves AT, et al. Characterization of CD4<sup>+</sup> cytotoxic lymphocytes and apoptosis markers induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol*. 2012;76(3):311-9.

Keiko Toma H, Penna Cerávolo I, Guerra HL, Steindel M, Romanha AJ. *Trypanosoma cruzi*: parasitaemia produced in mice does not seem to be related to in vitro parasite-cell interaction. *Int J Parasitol*. 2000;30(5):593-7.

Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, Spratt P, Galbraith A, O'Driscoll G, et al. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years: a randomized clinical trial. *Circulation*. 2004;110(17):2694-700.

Khan S, Salloum F, Das A, Xi L, Vetrovec GW, Kukreja RC. Rapamycin confers preconditioning-like protection against ischemia-reperfusion injury in isolated mouse heart and cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41(2):256-64.

Kimball SR, Jefferson LS, Nguyen HV, Suryawan A, Bush JA, Davis TA. Feeding stimulates protein synthesis in muscle and liver of neonatal pigs through an mTOR-dependent process. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(5):E1080-7.

Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*. 2008;4(6):740-3.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.

Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 2008;4(2):151-75.

Komarova EA, Antoch MP, Novototskaya LR, Chernova OB, Paszkiewicz G, Leontieva OV, et al. Rapamycin extends lifespan and delays tumorigenesis in heterozygous p53<sup>+/-</sup> mice. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(10):709-14.

Kovacs JR, Li C, Yang Q, Li G, Garcia IG, Ju S, et al. Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):144-52.

Ktistakis NT, Tooze SA. Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. *Trends Cell Biol*. 2016.

Kushwaha SS, Raichlin E, Sheinin Y, Kremers WK, Chandrasekaran K, Brunn GJ, et al. Sirolimus affects cardiomyocytes to reduce left ventricular mass in heart transplant recipients. *Eur Heart J*. 2008;29(22):2742-50.

Lai SC, Devenish RJ. LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy. *Cells*. 2012;1(3):396-408.

Lamb CA, Dooley HC, Tooze SA. Endocytosis and autophagy: Shared machinery for degradation. *Bioessays*. 2013;35(1):34-45.

Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(12):759-74.

Lantos AB, Carlevaro G, Araoz B, Ruiz Diaz P, Camara MeL, Buscaglia CA, et al. Sialic Acid Glycobiology Unveils *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Membrane Physiology. *PLoS Pathog*. 2016;12(4):e1005559.

Lavandero S, Chiong M, Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in cardiovascular biology. *J Clin Invest*. 2015;125(1):55-64.

Lazarin-Bidóia D, Desoti VC, Martins SC, Ribeiro FM, Ud Din Z, Rodrigues-Filho E, et al. Dibenzylideneacetones Are Potent Trypanocidal Compounds That Affect the *Trypanosoma cruzi* Redox System. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(2):890-903.

Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(8):556-70.

Levine B, Klionsky DJ. Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(2):201-5.

Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med*. 1988;168(2):649-59.

Ley V, Robbins ES, Nussenzweig V, Andrews NW. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Med*. 1990;171(2):401-13.

Li Y, Shah-Simpson S, Okrah K, Belew AT, Choi J, Caradonna KL, et al. Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. *PLoS Pathog*. 2016;12(4):e1005511.

Lima JG, de Freitas Vinhas C, Gomes IN, Azevedo CM, dos Santos RR, Vannier-Santos MA, et al. Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;405(4):604-9.

Lizardo K, Almonte V, Law C, Aiyappan JP, Cui MH, Nagajyothi JF. Diet regulates liver autophagy differentially in murine acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res.* 2017;116(2):711-23.

Machado FC, Cruz L, da Silva AA, Cruz MC, Mortara RA, Roque-Barreira MC, et al. Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. *Glycobiology.* 2014;24(2):179-84.

Machado FS, Jelicks LA, Kirchhoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, et al. Chagas heart disease: report on recent developments. *Cardiol Rev.* 2012;20(2):53-65.

Machado-Silva A, Cerqueira PG, Grazielle-Silva V, Gadelha FR, Peloso EeF, Teixeira SM, et al. How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2016;767:8-22.

Maeda FY, Alves RM, Cortez C, Lima FM, Yoshida N. Characterization of the infective properties of a new genetic group of *Trypanosoma cruzi* associated with bats. *Acta Trop.* 2011;120(3):231-7.

Maeda FY, Cortez C, Alves RM, Yoshida N. Mammalian cell invasion by closely related *Trypanosoma* species *T. dionisii* and *T. cruzi*. *Acta Trop.* 2012;121(2):141-7.

Maguire JH, Hoff R, Sleigh AC, Mott KE, Ramos NB, Sherlock IA. An outbreak of Chagas' disease in southwestern Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1986;35(5):931-6.

Majeski AE, Dice JF. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(12):2435-44.

Manque PA, Probst CM, Probst C, Pereira MC, Rampazzo RC, Ozaki LS, et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. *Infect Immun.* 2011;79(5):1855-62.

Martinet W, Knaapen MW, Kockx MM, De Meyer GR. Autophagy in cardiovascular disease. *Trends Mol Med.* 2007;13(11):482-91.

Martinez J, Almendinger J, Oberst A, Ness R, Dillon CP, Fitzgerald P, et al. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(42):17396-401.

Martinez J, Malireddi RK, Lu Q, Cunha LD, Pelletier S, Gingras S, et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat Cell Biol.* 2015;17(7):893-906.

Martinez J, Malireddi RK, Lu Q, Cunha LD, Pelletier S, Gingras S, et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat Cell Biol.* 2015;17(7):893-906.

Martinez J, Verbist K, Wang R, Green DR. The relationship between metabolism and the autophagy machinery during the innate immune response. *Cell Metab.* 2013;17(6):895-900.

Martins RM, Alves RM, Macedo S, Yoshida N. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. *Cell Microbiol.* 2011;13(7):943-54.

Maruyama M, Li BY, Chen H, Xu X, Song LS, Guatimosim S, et al. FKBP12 is a critical regulator of the heart rhythm and the cardiac voltage-gated sodium current in mice. *Circ Res.* 2011;108(9):1042-52.

Maruyama R, Goto K, Takemura G, Ono K, Nagao K, Horie T, et al. Morphological and biochemical characterization of basal and starvation-induced autophagy in isolated adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(4):H1599-607.

Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev.* 2016.

Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;146(4):601-20.

Meirelles MN, de Araujo-Jorge TC, Miranda CF, de Souza W, Barbosa HS. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *Eur J Cell Biol.* 1986;41(2):198-206.

Mellor KM, Bell JR, Young MJ, Ritchie RH, Delbridge LM. Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(6):1035-43.

Melo RC. Depletion of immune effector cells induces myocardial damage in the acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: ultrastructural study in rats. *Tissue Cell.* 1999;31(3):281-90.

Melo RC, Machado CR. *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. *Exp Parasitol.* 2001;97(1):15-23.

Menna-Barreto RF, Corrêa JR, Cascabulho CM, Fernandes MC, Pinto AV, Soares MJ, et al. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2009;136(5):499-510.

Menna-Barreto RF, Corrêa JR, Pinto AV, Soares MJ, de Castro SL. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from beta-lapachone. *Parasitol Res*. 2007;101(4):895-905.

Menna-Barreto RF, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron*. 2009;40(2):157-68.

Menna-Barreto RF, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron*. 2009;40(2):157-68.

Michels PA, Bringaud F, Herman M, Hannaert V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(12):1463-77.

Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*. 2011;7(7):673-82.

Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Baur JA, Boyd AR, de Cabo R, et al. Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011;66(2):191-201.

Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Fernandez E, Flurkey K, Han M, et al. Rapamycin-mediated lifespan increase in mice is dose and sex dependent and metabolically distinct from dietary restriction. *Aging Cell*. 2014;13(3):468-77.

Minoprio PM, Coutinho A, Joskowicz M, D'Imperio Lima MR, Eisen H. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 1986;24(6):669-79.

Minoprio PM, Eisen H, Forni L, D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol*. 1986;24(6):661-8.

Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, et al. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand J Immunol*. 1988;28(5):553-61.

Minoprio P, Coutinho A. Lymphocyte subpopulations and clonal repertoires participate in immune response to acute *T. cruzi* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988;83 Suppl 1:356-9.

Mitroulis I, Kourtzelis I, Papadopoulos VP, Mimidis K, Speletas M, Ritis K. In vivo induction of the autophagic machinery in human bone marrow cells during *Leishmania donovani* complex infection. Parasitol Int. 2009;58(4):475-7.

Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). Ann Trop Med Parasitol. 2006;100(8):663-77.

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104 Suppl 1:17-30.

Monnerat G, Alarcón ML, Vasconcellos LR, Hochman-Mendez C, Brasil G, Bassani RA, et al. Macrophage-dependent IL-1 $\beta$  production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice. Nat Commun. 2016;7:13344.

Morato MJ, Colley DG, Powell MR. Cytokine profiles during experimental Chagas' disease. Braz J Med Biol Res. 1998;31(1):123-5.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. N Engl J Med. 2015;373(14):1295-306.

Mortara RA, Andreoli WK, Taniwaki NN, Fernandes AB, Silva CV, Fernandes MC, et al. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. An Acad Bras Cienc. 2005;77(1):77-94.

Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, Sadighi-Akha E, et al. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. J Exp Med. 2011;208(3):455-67.

Mukherjee A, Patel B, Koga H, Cuervo AM, Jenny A. Selective endosomal microautophagy is starvation-inducible in *Drosophila*. Autophagy. 2016;12(11):1984-99.

Nada A, Gintant GA, Kleiman R, Gutstein DE, Gottfridsson C, Michelson EL, et al. The evaluation and management of drug effects on cardiac conduction (PR and QRS intervals) in clinical development. Am Heart J. 2013;165(4):489-500.

Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, Herz J, et al. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(2):e953.

Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*. 2007;13(5):619-24.

Nathan C, Nogueira N, Juangbhanich C, Ellis J, Cohn Z. Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*. 1979;149(5):1056-68.

Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature*. 2008;455(7211):396-400.

Neff F, Flores-Dominguez D, Ryan DP, Horsch M, Schröder S, Adler T, et al. Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3272-91.

Nishida K, Kyoji S, Yamaguchi O, Sadoshima J, Otsu K. The role of autophagy in the heart. *Cell Death Differ*. 2009;16(1):31-8.

Nogueira N, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J Exp Med*. 1976;143(6):1402-20.

Nomizo A, Cardillo F, Postól E, de Carvalho LP, Mengel J. V gamma 1 gammadelta T cells regulate type-1/type-2 immune responses and participate in the resistance to infection and development of heart inflammation in *Trypanosoma cruzi*-infected BALB/c mice. *Microbes Infect*. 2006;8(3):880-8.

Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(3):211-6.

Ohsumi Y, Ohsumi M, Baba M. [Autophagy in yeast]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 1993;38(1):46-52.

Onizuka Y, Takahashi C, Uematsu A, Shinjo S, Seto E, Nakajima-Shimada J. Inhibition of autolysosome formation in host autophagy by *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop*. 2017;170:57-62.

OREN R, FARNHAM AE, SAITO K, MILOFSKY E, KARNOVSKY ML. Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. *J Cell Biol*. 1963;17:487-501.

Saúde OMD. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>: Organização Mundial da Saúde; 2016 [Organization) OmdSWH. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva, Switzerland; 2010.

Saúde OPd. Map - Chagas disease vector transmission (2014)[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743) 2014 [

Paiva CN, Feijó DF, Dutra FF, Carneiro VC, Freitas GB, Alves LS, et al. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(7):2531-42.

Paiva CN, Figueiredo RT, Kroll-Palhares K, Silva AA, Silvério JC, Gibaldi D, et al. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol.* 2009;86(5):1239-46.

Park JM, Jung CH, Seo M, Otto NM, Grunwald D, Kim KH, et al. The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14. *Autophagy.* 2016;12(3):547-64.

Paschoal VA, Amano MT, Belchior T, Magdalon J, Chimin P, Andrade ML, et al. mTORC1 inhibition with rapamycin exacerbates adipose tissue inflammation in obese mice and dissociates macrophage phenotype from function. *Immunobiology.* 2017;222(2):261-71.

Pecoul B, Batista C, Stobbaerts E, Ribeiro I, Vilasanjuan R, Gascon J, et al. The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(2):e0004343.

Pedrozo Z, Torrealba N, Fernández C, Gatica D, Toro B, Quiroga C, et al. Cardiomyocyte ryanodine receptor degradation by chaperone-mediated autophagy. *Cardiovasc Res.* 2013;98(2):277-85.

Peñaranda-Carrillo R, Castro C, Rezende J, Prata A, Macêdo V. [Radiographic study of the oesophagus of chagasic patients in 25 years of the Mambáí Project]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(2):152-5.

Pereira IR, Vilar-Pereira G, Marques V, da Silva AA, Caetano B, Moreira OC, et al. A human type 5 adenovirus-based *Trypanosoma cruzi* therapeutic vaccine re-programs immune response and reverses chronic cardiomyopathy. *PLoS Pathog.* 2015;11(1):e1004594.

Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot.* 2009;72(2):441-6.

Perez-Molina JA, Perez-Ayala A, Parola P, Jackson Y, Odolini S, Lopez-Velez R, et al. EuroTravNet: imported Chagas disease in nine European countries, 2008 to 2009. *Euro Surveill.* 2011;16(37).



Perrotta I, Carito V, Russo E, Tripepi S, Aquila S, Donato G. Macrophage autophagy and oxidative stress: an ultrastructural and immunoelectron microscopical study. *Oxid Med Cell Longev*. 2011;2011:282739.

Piacenza L, Alvarez MN, Peluffo G, Radi R. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr Opin Microbiol*. 2009;12(4):415-21.

Pietrocola F, Demont Y, Castoldi F, Enot D, Durand S, Semeraro M, et al. Metabolic effects of fasting on human and mouse blood in vivo. *Autophagy*. 2017:1-12.

Pinazo MJ, Muñoz J, Posada E, López-Chejade P, Gállego M, Ayala E, et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4896-9.

Pinazo MJ, Thomas MC, Bua J, Perrone A, Schijman AG, Viotti RJ, et al. Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(4):479-96.

Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect*. 2009;11(2):181-90.

Powell JD, Delgoffe GM. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity*. 2010;33(3):301-11.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2001;1(2):92-100.

Procópio DO, Barros HC, Mortara RA. Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Cell Biol*. 1999;78(12):911-24.

Proikas-Cezanne T, Robenek H. Freeze-fracture replica immunolabelling reveals human WIPI-1 and WIPI-2 as membrane proteins of autophagosomes. *J Cell Mol Med*. 2011;15(9):2007-10.

Pua HH, Dzhagalov I, Chuck M, Mizushima N, He YW. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J Exp Med*. 2007;204(1):25-31.

Pua HH, Guo J, Komatsu M, He YW. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J Immunol*. 2009;182(7):4046-55.

Pua HH, He YW. Autophagy and lymphocyte homeostasis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;335:85-105.

Pua HH, He YW. Mitophagy in the little lymphocytes: an essential role for autophagy in mitochondrial clearance in T lymphocytes. *Autophagy*. 2009;5(5):745-6.

Ramírez JD, Montilla M, Cucunubá ZM, Floréz AC, Zambrano P, Guhl F. Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2):e2041.

Ramírez-Peinado S, León-Annicchiarico CL, Galindo-Moreno J, Iurlaro R, Caro-Maldonado A, Prehn JH, et al. Glucose-starved cells do not engage in pro-survival autophagy. *J Biol Chem*. 2013;288(42):30387-98.

Ramos FJ, Chen SC, Garelick MG, Dai DF, Liao CY, Schreiber KH, et al. Rapamycin reverses elevated mTORC1 signaling in lamin A/C-deficient mice, rescues cardiac and skeletal muscle function, and extends survival. *Sci Transl Med*. 2012;4(144):144ra03.

Rassi A, Dias JC, Marin-Neto JA. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart*. 2009;95(7):524-34.

Rassi A, Marin JA. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(3):224-35.

Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388-402.

Reed SG. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol*. 1988;140(12):4342-7.

Requena-Méndez A, López MC, Angheben A, Izquierdo L, Ribeiro I, Pinazo MJ, et al. Evaluating Chagas disease progression and cure through blood-derived biomarkers: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(9):957-76.

Roberts DJ, Tan-Sah VP, Ding EY, Smith JM, Miyamoto S. Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition. *Mol Cell*. 2014;53(4):521-33.

Roberts P, Moshitch-Moshkovitz S, Kvam E, O'Toole E, Winey M, Goldfarb DS. Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2003;14(1):129-41.

Rodríguez-Guardado A, González ML, Rodríguez M, Flores-Chavez M, Boga JA, Gascon J. *Trypanosoma cruzi* infection in a Spanish liver transplant recipient. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(7):687.e1-3.

Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(1):3-24.

Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(1):3-24.

Romano PS, Arboit MA, Vázquez CL, Colombo MI. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. Autophagy. 2009;5(1):6-18.

Romano PS, Cueto JA, Casassa AF, Vanrell MC, Gottlieb RA, Colombo MI. Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. IUBMB Life. 2012;64(5):387-96.

Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. Dev Cell. 2011;20(1):131-9.

Sakagami H, Kishino K, Amano O, Kanda Y, Kunii S, Yokote Y, et al. Cell death induced by nutritional starvation in mouse macrophage-like RAW264.7 cells. Anticancer Res. 2009;29(1):343-7.

Salemi S, Yousefi S, Constantinescu MA, Fey MF, Simon HU. Autophagy is required for self-renewal and differentiation of adult human stem cells. Cell Res. 2012;22(2):432-5.

Salomão K, Castro SL. Recent advances in drug development for Chagas disease: two magic words, combination and repositioning. . In: L L, EC T-S, editors. Different Aspects on Chemotherapy of Trypanosomatids. 1. New York2017. p. 181-226.

San Francisco J, Barría I, Gutiérrez B, Neira I, Muñoz C, Sagua H, et al. Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. Microbes Infect. 2017;19(1):55-61.

Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. Nature. 2007;450(7173):1253-7.

Sanjuan MA, Milasta S, Green DR. Toll-like receptor signaling in the lysosomal pathways. Immunol Rev. 2009;227(1):203-20.

Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. J Antimicrob Chemother. 2005;55(5):780-4.

Santamaria C, Chatelain E, Jackson Y, Miao Q, Ward BJ, Chappuis F, et al. Serum biomarkers predictive of cure in Chagas disease patients after nifurtimox treatment. BMC Infect Dis. 2014;14:302.

Santana JM, Grellier P, Schrével J, Teixeira AR. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J.* 1997;325 ( Pt 1):129-37.

Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Toma HK, Georg I, Burgoa MR, Lima MM. Eco-epidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments. *Parasitol Res.* 2012;110(4):1481-5.

Schenkman S, Mortara RA. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J Cell Sci.* 1992;101 ( Pt 4):895-905.

Scherz-Shouval R, Shvets E, Elazar Z. Oxidation as a post-translational modification that regulates autophagy. *Autophagy.* 2007;3(4):371-3.

Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 2007;26(7):1749-60.

Schiattarella GG, Hill JA. Therapeutic targeting of autophagy in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;95:86-93.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102 Suppl 1:75-85.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010;115(1-2):14-21.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 2006;22(12):583-8.

Schoijet AC, Sternlieb T, Alonso GD. The Phosphatidylinositol 3-kinase Class III Complex Containing TcVps15 and TcVps34 Participates in Autophagy in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol.* 2017;64(3):308-21.

Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc.* 2003;35(3 Suppl):7S-14S.

Sehgal SN, Baker H, Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo).* 1975;28(10):727-32.

Shi M, Zhang Y, Liu L, Zhang T, Han F, Cleveland J, et al. MAP1S Protein Regulates the Phagocytosis of Bacteria and Toll-like Receptor (TLR) Signaling. *J Biol Chem.* 2016;291(3):1243-50.

Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012;54(6):845-52.

Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991;33(5):351-7.

Shimomura H, Terasaki F, Hayashi T, Kitaura Y, Isomura T, Suma H. Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J*. 2001;65(11):965-8.

Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ, et al. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*. 2003;107(12):1664-70.

Shui W, Sheu L, Liu J, Smart B, Petzold CJ, Hsieh TY, et al. Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(44):16952-7.

Singh S, Kumari E, Bhardwaj R, Kumar R, Dubey VK. Molecular events leading to death of *Leishmania donovani* under spermidine starvation after hypericin treatment. *Chem Biol Drug Des*. 2017.

Soares MJ. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:139-41.

Sosa-Estani S, Segura EL. Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):289-98.

Souto XM, Barbosa HS, Menna-Barreto RF. The morphological analysis of autophagy in primary skeletal muscle cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*. 2016;115(7):2853-61.

Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun*. 2004;72(9):5283-91.

Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;60(1):25-32.

Stranks AJ, Hansen AL, Panse I, Mortensen M, Ferguson DJ, Puleston DJ, et al. Autophagy Controls Acquisition of Aging Features in Macrophages. *J Innate Immun.* 2015;7(4):375-91.

Takehige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol.* 1992;119(2):301-11.

Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(11):2201-14.

Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, et al. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis.* 2009;51(6):524-39.

Tanowitz HB, Machado FS, Spray DC, Friedman JM, Weiss OS, Lora JN, et al. Developments in the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2015;13(12):1393-409.

Tanowitz HB, Wittner M, Chen B, Huang H, Weiss LM, Christ GJ, et al. Effects of verapamil on acute murine Chagas' disease. *J Parasitol.* 1996;82(5):814-9.

Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell.* 1992;71(7):1117-30.

Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol.* 2001;31(5-6):550-4.

Terman A, Brunk UT. Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology. *Cardiovasc Res.* 2005;68(3):355-65.

Trochine A, Creek DJ, Faral-Tello P, Barrett MP, Robello C. Benzimidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(5):e2844.

Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1993;333(1-2):169-74.

Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* 2010;115(1-2):55-68.

Vaena de Avalos S, Blader IJ, Fisher M, Boothroyd JC, Burleigh BA. Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. *J Biol Chem.* 2002;277(1):639-44.

Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvão LM, et al. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol*. 1996;149(6):2153-9.

Valdor R, Mocholi E, Botbol Y, Guerrero-Ros I, Chandra D, Koga H, et al. Chaperone-mediated autophagy regulates T cell responses through targeted degradation of negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1046-54.

Valente SA, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, de Jesus Barbosa César M, dos Santos MP, Miranda CO, et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103(3):291-7.

Veiga-Santos P, Barrias ES, Santos JF, de Barros Moreira TL, de Carvalho TM, Urbina JA, et al. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(1):61-71.

Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975;28(10):721-6.

Vieira MC, de Carvalho TU, de Souza W. Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;203(2):967-71.

Vieira PM, Francisco AF, Machado EM, Nogueira NC, Fonseca KaS, Reis AB, et al. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental Chagas disease. *PLoS One*. 2012;7(3):e32912.

Vilar-Pereira G, Carneiro VC, Mata-Santos H, Vicentino AR, Ramos IP, Giarola NL, et al. Resveratrol Reverses Functional Chagas Heart Disease in Mice. *PLoS Pathog*. 2016;12(10):e1005947.

Villalta F, Scharfstein J, Ashton AW, Tyler KM, Guan F, Mukherjee S, et al. Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions. *Parasitol Res*. 2009;104(6):1251-60.

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*. 2006;144(10):724-34.

Waghbi MC, Keramidis M, Bailly S, Degrave W, Mendonça-Lima L, Soeiro MeN, et al. Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi*

amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *Am J Pathol.* 2005;167(4):993-1003.

Waltz P, Carchman EH, Young AC, Rao J, Rosengart MR, Kaczorowski D, et al. Lipopolysaccharide induces autophagic signaling in macrophages via a TLR4, heme oxygenase-1 dependent pathway. *Autophagy.* 2011;7(3):315-20.

Wang Y, Weiss LM, Orlofsky A. Host cell autophagy is induced by *Toxoplasma gondii* and contributes to parasite growth. *J Biol Chem.* 2009;284(3):1694-701.

Wang ZV, Ferdous A, Hill JA. Cardiomyocyte autophagy: metabolic profit and loss. *Heart Fail Rev.* 2013;18(5):585-94.

Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(24):4721-57.

Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl P, Isola EL. *Trypanosoma cruzi*. phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp Cell Res.* 2001;264(2):211-8.

Williams T, Forsberg LJ, Viollet B, Brenman JE. Basal autophagy induction without AMP-activated protein kinase under low glucose conditions. *Autophagy.* 2009;5(8):1155-65.

Wirth M, Joachim J, Tooze SA. Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Semin Cancer Biol.* 2013;23(5):301-9.

Woolsey AM, Burleigh BA. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cell Microbiol.* 2004;6(9):829-38.

Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 17):3611-22.

Wullschleger S, Loewith R, Oppliger W, Hall MN. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem.* 2005;280(35):30697-704.

Yacoub S, Mocumbi AO, Yacoub MH. Neglected tropical cardiomyopathies: I. Chagas disease: myocardial disease. *Heart.* 2008;94(2):244-8.

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

Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science.* 2004;304(5676):1500-2.



Yu L, Lenardo MJ, Baehrecke EH. Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle*. 2004;3(9):1124-6.

Zhang JL, Lu JK, Chen D, Cai Q, Li TX, Wu LS, et al. Myocardial autophagy variation during acute myocardial infarction in rats: the effects of carvedilol. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(19):2372-9.

Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis*. 1999;180(2):480-6.

Zhang Y, Morgan MJ, Chen K, Choksi S, Liu ZG. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. *Blood*. 2012;119(12):2895-905.

Zhao YO, Khaminets A, Hunn JP, Howard JC. Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN $\gamma$ -inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. *PLoS Pathog*. 2009;5(2):e1000288.

Zhao Y, Wilson D, Matthews S, Yap GS. Rapid elimination of *Toxoplasma gondii* by gamma interferon-primed mouse macrophages is independent of CD40 signaling. *Infect Immun*. 2007;75(10):4799-803.

Zois CE, Giatromanolaki A, Sivridis E, Papaiakovou M, Kainulainen H, Koukourakis MI. "Autophagic flux" in normal mouse tissues: focus on endogenous LC3A processing. *Autophagy*. 2011;7(11):1371-8.