

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

PAULA CRISTINA BRÍGIDO TAVARES

EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO REPARO DE
MEMBRANA E DINÂMICA DO CITOESQUELETO DE ACTINA EM MIOBLASTOS
INFECTADOS PELO *Trypanosoma cruzi*.

UBERLÂNDIA

2016

PAULA CRISTINA BRÍGIDO TAVARES

**EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO REPARO DE
MEMBRANA E DINÂMICA DO CITOESQUELETO DE ACTINA EM MIOBLASTOS
INFECTADOS PELO *Trypanosoma cruzi*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

UBERLÂNDIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

T231e
2016

Tavares, Paula Cristina Brígido, 1986
Expressão gênica de proteínas associadas ao reparo de membrana e
dinâmica do citoesqueleto de actina em mioblastos infectados pelo
Trypanosoma cruzi / Paula Cristina Brígido Tavares. - 2016.
59 f. : il.

Orientadora: Maria Aparecida de Souza.
Coorientador: Claudio Vieira da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Trypanosoma cruzi - Teses. 3. Chagas,
Doença de - Teses. I. Souza, Maria Aparecida de. II. Silva, Claudio
Vieira da. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

As minhas filhas Maria Julia, Vitória Sophia e
Isabella, e a minha esposa pelo tempo que deixamos de estar juntas...

À minha mãe Vilma, pelos ensinamentos dos valores da vida...

À minha irmã Priscylla pelo companheirismo e amizade...

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Souza e ao meu coorientador Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva pela confiança, pelo constante incentivo ao crescimento profissional e pelas inúmeras possibilidades oferecidas.

À doutoranda Rebecca Tavares e Silva Brígido pela constante ajuda e apoio em todo trabalho, sem você não seria possível desenvolver esse trabalho.

A todos aqueles que estiveram comigo no laboratório, meus amigos, minha família LATRI, pela agradável convivência e aprendizagem diária.

Ao querido Marlus, meu amigo e mestre, pelos ensinamentos e paciência.

A todos os laboratórios da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) que cooperaram com o desenvolvimento do projeto por meio de troca de materiais e do uso de equipamentos, e aos seus alunos e funcionários.

Agradeço aos colegas, professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Agradeço às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia pela paciência e constante ajuda.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado para o desenvolvimento deste estudo.

E, acima de tudo, a Deus por me iluminar e dar força para lidar com as dificuldades.

O maior inimigo do conhecimento não é ignorância, mas a ilusão do conhecimento.
Stephen Hawking.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | X |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | VIII |
| RESUMO..... | XIII |
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> E DOENÇA DE CHAGAS - ASPECTOS GERAIS | 16 |
| 1.2 SINALIZAÇÃO CELULAR, INVASÃO E REPARO DE MEMBRANA DURANTE A INVASÃO CELULAR POR <i>T. cruzi</i> | 19 |
| 1.3 GALECTINAS E ANEXINAS | 22 |
| 1.4 OBJETIVO GERAL..... | 23 |
| 1.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 24 |
| 2 MATERIAL E MÉTODO | 26 |
| LOCAL DO ESTUDO | 26 |
| 2.1 CÉLULAS PARA MANUTENÇÃO DO CICLO DE <i>T. cruzi</i> | 26 |
| 2.2 CEPA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> | 26 |
| 2.3 CULTURA DE CÉLULAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE INVASÃO | 27 |
| 2.4 INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS..... | 27 |
| 2.5 OBTENÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEOS PARA A INFECÇÃO DAS CÉLULAS VERO..... | 27 |
| 2.6 CULTURA DAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS <i>IN VITRO</i> | 28 |
| 2.7 DROGA INIBIDORA DA VIA DE SINALIZAÇÃO | 28 |
| 2.8 ENSAIO DE INVASÃO EM MIOBLASTO..... | 28 |
| 2.9 ENSAIO DE INVASÃO PARA OBTENÇÃO DE RNA E DNA | 29 |
| 2.10 EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QPCR) | 30 |
| 2.11 PCR CONVENCIONAL..... | 31 |
| 2.12 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (CDNA), E TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DE PCR (RT-QPCR) | 32 |
| 2.13 QUANTIFICAÇÃO GÊNICA RELATIVA POR PCR EM TEMPO REAL..... | 32 |
| 2.14 NORMAS DE BIOSSEGURANÇA..... | 34 |
| 2.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 34 |
| 3 RESULTADOS..... | 37 |
| 3.1 DESENHO DOS INICIADORES | 37 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3.2 | ESPECIFICIDADE DO PRIMER PARA QUANTIFICAÇÃO DO DNA | 37 |
| 3.3 | TESTE DOS PRIMERS PARA QUANTIFICAÇÃO DO DNA..... | 38 |
| 3.4 | ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS UTILIZADOS NO RT-QPCR MEDIANTE A CURVA DE DISSOCIAÇÃO | 39 |
| 3.5 | ANÁLISE DA QUALIDADE DO DNA E DO RNA..... | 40 |
| 3.6 | CARGA PARASITÁRIA FOI MAIOR NOS TEMPOS POSTERIORES DA CINÉTICA DE INFECÇÃO EM MIOBLASTO..... | 41 |
| 3.7 | A INFECÇÃO DE <i>T. cruzi</i> EM MIOBLASTO INDUZ O AUMENTO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TFEB, DISFERLINA, E ASM NOS TEMPOS POSTERIORES DA CINÉTICA DE INVASÃO. | 42 |
| 3.8 | A INIBIÇÃO DA MTOR PROMOVE A DIMINUIÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO EM MIOBLASTOS | 43 |
| 3.9 | TRATAMENTO COM RAPAMICINA ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA DE ANEXINA A2, TFEB E ASM DURANTE A INFECÇÃO DE MIOBLASTO..... | 44 |
| 4 | DISCUSSÃO | 47 |
| 5 | CONCLUSÕES | 52 |
| | REFERÊNCIAS..... | 53 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

- Figura 1** FORMAS EVOLUTIVAS DO *Trypanosoma cruzi*.
- Figura 2** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DE VIDA DO PROTOZOÁRIO FLAGELADO *Trypanosoma cruzi*.
- Figura 3** ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE INVASÃO POR *T.cruzi* EM MIOBLASTO E A AÇÃO DE CADA PROTEÍNA.
- Tabela 1** Iniciadores utilizados para a análise da expressão gênica por PCR em tempo real.
- Tabela 2** Validação dos primers para os genes de Galectina-1, Galectina-3, Anexina-A1, Anexina-A2, Disferlina, TFEB e ASM.
- Figura 4** Especificidade da primer P21
- Figura 5:** Especificidade do primer P21 em Gel de agarose
- Figura 6** Curva de dissociação gerada pela RT-qPCR
- Figura 7** Cinética da internalização de *T. cruzi* em mioblasto
- Figura 8** Expressão gênica na cinética de invasão em mioblasto
- Figura 9** Taxa da inibição da internalização de *T. cruzi* em mioblasto após tratamento com Rampamicina.
- Figura 10** Modulação da expressão gênica em mioblasto após a tratamento com Rampamicina infecção por *T. cruzi*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------|---|
| µg: | Micrograma |
| µL: | Microlitro |
| µM: | Micromolar |
| ASM: | enzima esfingomielinase ácida |
| AXNA1: | Anexina- A1 |
| AXNA2: | Anexina-A2 |
| C2C12: | Células musculares |
| Ca²⁺: | Molécula de Cálcio |
| CO₂: | Gás Dióxido de Carbono |
| CT: | Cycle Threshold- Ciclo limiar de quantificação |
| DC: | Doença de Chagas |
| DMEM: | Meio Eagle Modificado por Dulbecco |
| DNA: | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP: | Desoxirribonucleotídeos Fosfatados |
| dUTP: | Desoxinucleotídeo |
| EDTA: | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| F-actina: | Filamentos de actina |
| Fw: | Forward primer |
| g: | G-force |
| Gal-1: | Galectina-1 |
| Gal-3: | Galectina-3 |
| GAPDH: | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |
| HEPES: | <i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i> |
| kDNA: | Ácido desoxirribonucleico de cinetoplasto |
| mRNA: | RNA mensageiro |
| mTOR: | Mammalian target of rapamycin (alvo da rapamicina em mamíferos) |
| ng: | Nanograma |
| nM: | Nanomolar |

| | |
|---------------------------------------|---|
| PBS: | Solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2 |
| PCR: | Reação em cadeia da polimerase |
| qPCR: | PCR quantitativo em tempo real |
| R²: | Coeficiente de regressão linear |
| RT-qPCR: | Reação de transcrição reversa, seguida da PCR |
| Rw: | Reverse primer |
| SFB: | Soro fetal bovino |
| TFEB: | Fator de transcrição EB |
| TM: | Temperatura de Melting |
| VERO: | Fibroblastos de rim de macaco verde da África |
| BLAST: | Basic Local Alignment Search Tool |
| $\Delta\Delta C_t$: | Metodo Delta, Delta Ct |
| μM: | Microlitro |
| GAPDH: | <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> |
| AE: | Amastigotas Extracelular |

RESUMO

Trypanosoma cruzi é o agente causador da doença de Chagas, uma das doenças tropicais mais negligenciadas. Estima-se que cerca de 11 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo *T. cruzi* e cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estão em risco por encontrarem-se em áreas endêmicas. Durante o processo de invasão moléculas do parasita e do hospedeiro interagem permitindo a transdução de sinal e a expressão de genes de modulação em resposta à invasão. A diversidade de proteínas e vias acionadas para reparar a lesão pela ruptura da membrana plasmática nos interessou e dessa forma o presente estudo visou investigar o impacto da infecção por *T. cruzi* em mioblastos murino por meio da expressão gênica da Disferlina, Esfingomielinase ácida (ASM), Fator de Transcrição EB (TFEB), Galectinas 1 e 3, Anexinas A1 e A2. Assim, analisou-se a expressão gênica por meio da quantificação relativa (RT-qPCR) e a carga parasitária (qPCR). No presente estudo foi demonstrado um aumento da expressão do gene Disferlina, ASM e TFEB durante a cinética de 2 horas de invasão pela cepa Y de *T. cruzi* em mioblastos. Além disso, o tratamento com rapamicina inibiu a via de sinalização mTOR, acarretando na diminuição da internalização celular e regulação negativa da expressão de TFEB, ASM e Anexina A2 em mioblastos tratados e infectados em comparação a mioblastos não tratados com rapamicina e infectado. Os resultados aqui apresentados sugerem que durante a invasão celular por *T. cruzi*, a expressão do gene da célula hospedeira é modulada em resposta ao dano gerado pelo parasita.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Expressão gênica, Mioblastos, Reparo da membrana.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease, one of the most neglected tropical diseases. It is estimated that about 11 million people worldwide are infected with *T. cruzi*, about 6 million to 7 million people are estimated to be infected worldwide. During the molecules invasion process of the parasite and host interact allowing the signal transduction and modulation gene expression in response to invasion. The diversity of proteins and pathways triggered to repair wounded plasma membrane turned our attention to investigate the impact of *T. cruzi* infection in gene expression of Dysferlin, ASM, TFEB, Galectin 1 and 3, Annexin 1 and 2, by murine myoblasts. Thus we analyzed the expression of genes by quantifying the relative and parasitic load by real-time PCR. We conclude that our study found increased Dysferlin gene expression, ASM and TFEB during the invasion, kinetics for two hours by *T. cruzi* Y strain in myoblasts. Moreover treatment with Rapamycin inhibited mTOR signaling pathway, decreased cellular internalization and negatively regulating the expression of TFEB, ASM and Annexin A2 in myoblasts treated and infected as compared to myoblasts untreated with Rapamycin and infected. Our results show that during cell invasion by *T. cruzi*, host cell gene expression is modulated in response to the damage generated by the parasite.

Key words: *T. cruzi* Y strain, gene expression, myoblasts, membrane repair, cell infection

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* E DOENÇA DE CHAGAS - ASPECTOS GERAIS

A tripanossomíase americana ou Doença de Chagas (DC) é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma doença tropical negligenciada ocasionada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e representa um grave problema de saúde e econômico para humanidade (ARAÚJO et al., 2009; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012; PEREIRA; NAVARRO, 2013).

Estima-se que no mundo existam 8-11 milhões de pessoas infectadas pelo protozoário, e que 6 a 7 milhões vivam sob-risco de contaminação, principalmente na América Latina onde a doença de chagas é endêmica, constituindo assim problema preocupante de saúde pública (SCHOFIELD et al., 2006; COURA; VIÑAS, 2010; MARTINS-MELO et al., 2014; HENAO-MARTÍNEZ et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2015; “WHO,” 2016). Nos últimos anos, a ocorrência da DC tem sido observada em áreas não endêmicas como América do Norte e Europa devido aos fluxos migratórios internacionais, compondo um novo desafio para o enfrentamento desta doença (GASCON et al., 2010; SCHMUNIS; YADON, 2010). No Brasil acredita-se que existam cerca de 2 a 3 milhões de pessoas com a DC, acarretando aproximadamente 6.000 mortes por ano (MARTINS-MELO et al., 2012, 2014).

T. cruzi pertence ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. O protozoário é caracterizado pela presença de cinetoplasto, uma organela formada por DNA de estrutura circular extranuclear formando redes concatenadas conhecido por DNA do cinetoplasto ou kDNA (ARAÚJO et al., 2009; RASSI; MARIN-NETO, 2010; TEIXEIRA et al., 2011; PEREIRA; NAVARRO, 2013). Este hemoflagelado possui um ciclo de vida complexo, envolvendo hospedeiros vertebrados mamíferos e invertebrados hemípteros reduvídeos da subfamília Triatominae, assumindo diferentes estágios evolutivos com distinções morfológicas e físico-químicas (MAYA et al., 2007). Assim, podemos identificar três formas evolutivas distintas: epimastigota, tripomastigota e amastigota. As formas evolutivas são classificadas com base em parâmetros morfológicos, tais como, posição relativa do flagelo, do núcleo, do cinetoplasto, e possuem variações quanto à infectividade e patogenicidade durante seu ciclo de

vida. A forma replicativa no hospedeiro invertebrado é a epimastigota (Figura 1 B), com aproximadamente 20 μm de comprimento, se caracteriza por sua forma alongada (fusiforme), cinetoplasto discóide disposto anteriormente ao núcleo e com o flagelo livre surgindo da região anterior. A amastigota é uma forma replicativa (intracelular) e infectiva (extracelular), no hospedeiro vertebrado (Figura 1 A), são células com aproximadamente 2 a 5 μm de diâmetro, com formato arredondado e flagelo bem curto. Os tripomastigotas (Figura 1 C) são formas infectantes, tanto para o hospedeiro vertebrado como para o hospedeiro invertebrado. Esta forma evolutiva é não replicativa, medindo aproximadamente 25 μm de comprimento, alongada com cinetoplasto arredondado, posterior ao núcleo e flagelo, que percorre externamente toda extensão de seu corpo (BRENER, 1973; SOUZA, DE, 1984, 1999; TEIXEIRA et al., 2011).

O desenvolvimento de um estágio a outro é um processo complexo, envolvendo mudanças estruturais, antigênicas e fisiológicas, estando estas alterações sob comando de genes específicos (SANTOS, DOS et al., 2009; ARAÚJO et al., 2009; PEREIRA; NAVARRO, 2013).



Figura 1: Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. (A) Amastigostas, (B) Epimastigotas e (C) Tripomastigotas. Figura : Paula Brigido.

O parasita pode ser transmitido vetorialmente, congenitamente, em acidentes laboratoriais, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e mais recentemente descrito, por via oral (CEVALLOS; HERNÁNDEZ, 2014; MARTINS-MELO et al., 2014). Levando em consideração a transmissão vetorial, o ciclo (Figura 2) inicia-se quando o inseto vetor suga o sangue do hospedeiro contendo formas

tripomastigotas sanguíneas, que se modificam em formas epimastigotas no sistema digestório do inseto, onde se multiplicam intensamente, migram para a parte posterior do trato digestório do inseto e se transformam em formas tripomastigotas metacíclicas. Quando o inseto pica um novo vertebrado transmite essas formas infectantes pelas fezes e urina depositadas no local da picada. Posteriormente, estas formas evolutivas penetram pela pele lesada ou pelas mucosas, invadem células de vários tecidos e se transformam em amastigotas. Essas irão se multiplicar e se diferenciar em tripomastigotas que serão liberados, após o rompimento da célula hospedeira. As formas tripomastigotas liberadas migram para corrente sanguínea podendo invadir outras células ou serem sugados novamente pelo inseto vetor (ANDREWS et al., 1990; KOLLIEN; SCHAUB, 2000; HERNÁNDEZ-OSORIO et al., 2010; SOUZA, DE et al., 2010). Uma alternativa de sub-ciclo pode ocorrer envolvendo formas amastigotas procedentes da lise prematura das células infectadas, chamadas amastigotas intracelulares (HUDSON et al., 1984; CARVALHO; SOUZA, 1986) ou formas amastigotas extracelulares decorrentes de diferenciação extracelular de tripomastigotas (ALVES; MORTARA, 2009).

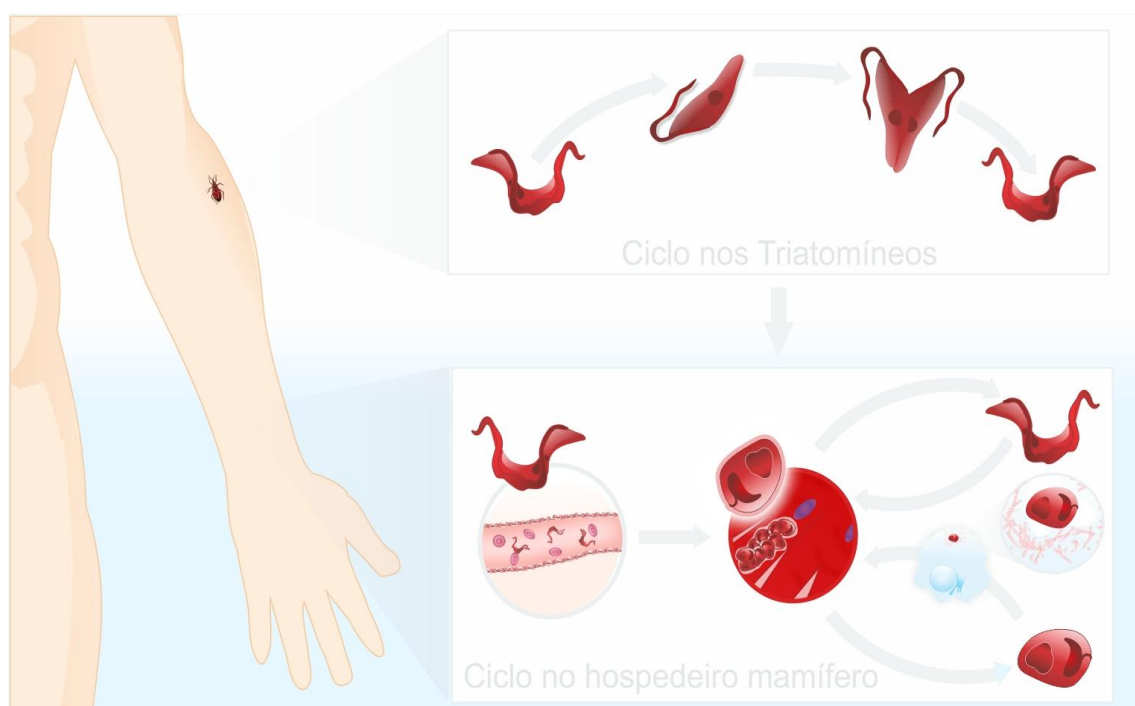


Figura 2: Representação esquemática do ciclo de vida do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Figura: Paula Brígido

A DC possui apresentação clínica variável. A fase aguda é caracterizada por parasitemia patente que pode perdurar até dois meses. Os sintomas podem ser moderados e atípicos, podendo ser confundidos com os de diversas outras infecções, e consequentemente a doença não é frequentemente reconhecida neste estágio (“WHO,” 2016). Depois da fase aguda, os pacientes entram na fase crônica da doença, na qual podem desenvolver quadros clínicos variados, desde brandos a muito graves, sendo caracterizado por baixa ou nenhuma parasitemia, mesmo que o paciente permaneça reativo em testes sorológicos de rotina (BHATTACHARYYA et al., 2010). Pessoas cronicamente infectadas e vivendo em áreas endêmicas constituem em importantes reservatórios do parasita. Até 20 anos após a infecção, aproximadamente 30% dos pacientes desenvolvem alterações cardíacas, e 10% alterações digestivas e neurológicas. Posteriormente, a infecção pode levar à morte súbita ou insuficiência cardíaca causada pela destruição progressiva do músculo cardíaco (TANOWITZ et al., 1992; CAMPOS DE CARVALHO et al., 2009; “WHO,” 2016).

1.2 SINALIZAÇÃO CELULAR, INVASÃO E REPARO DE MEMBRANA DURANTE A INVASÃO CELULAR POR *T. cruzi*.

T. cruzi está entre os mais bem sucedidos parasitos intracelulares, e poucos protozoários comparam-se a ele em termos de virulência e capacidade de infectar vários tipos celulares (NUNES et al., 2013). A interação entre a célula hospedeira durante a invasão e o estabelecimento da infecção por *T. cruzi* ativa processos de sinalização celular que culmina em alterações morfológicas, metabólicas e na modulação da expressão de diversos genes da célula hospedeira (MAEDA et al., 2012; GARCIA-SILVA et al., 2014), esses processos envolvidos durante a invasão, estabelecimento do parasita, patogenia da doença, bem como a interação molecular entre parasito-hospedeiro ainda não estão completamente esclarecidos (YOSHIDA, 2006; GUHL; RAMÍREZ, 2011).

Porém já é conhecido que *T. cruzi* durante a invasão promove mobilização de Ca^{+2} intracelular (Figura 3 A), tanto no parasito quanto na célula alvo (REDDY et al., 2001; JAISWAL et al., 2002; CHENG et al., 2015). A elevação de Ca^{+2} citosólico promove ativação de dois eventos cruciais para a invasão: remodelamento do

citoesqueleto de actina e exocitose de lisossomos (MACHADO et al., 2000; MARTINELLI et al., 2006; MARTINS et al., 2011; MAEDA et al., 2012). ANDREWS, (2002) destaca a importância dos rearranjos do citoesqueleto de actina cortical da célula hospedeira para o recrutamento e fusão dos lisossomos no sítio de invasão do parasita. Devemos levar em consideração que os lisossomos não são apenas organelas de degradação e geração de lixo intracelular, eles também são grandes responsáveis pelo reparo da membrana celular, por meio da exocitose lisossômica desencadeada por Ca^{+2} . Assim, quando membranas celulares sofrem danos, os lisossomos, são recrutados para se fundir ao revestimento da célula, reparando a lesão (REDDY et al., 2001; JAISWAL et al., 2002; GULBINS; KOLESNICK, 2003b; DEFOUR et al., 2014; SCHEFFER et al., 2014). Um estudo complementa a participação do lisossomo durante a invasão do parasita, os autores destacam que a fusão gradual dos lisossomos com o vacúolo parasitóforo evita o escape do parasita da célula hospedeira e promove sua permanência intracelular (ANDRADE; ANDREWS, 2004).

Recentemente tem sido demonstrado que a resposta dos lisossomos para os sinais fisiológicos são regulados pelo fator de transcrição EB (*TFEB*). *TFEB* é um gene regulador mestre da biogênese lisossômica e da autofagia, conduz à geração de novos lisossomos, induz a ancoragem, a fusão de lisossomos com a membrana plasmática e o aumento do número de autofagossomos em uma variedade de tipos de células (SARDIELLO et al., 2009; SETTEMBRE et al., 2011; SETTEMBRE; BALLABIO, 2011). Alguns pesquisadores descobriram que *TFEB* interage com o alvo da rapamicina de mamíferos (mTOR), uma quinase localizada nos lisossomos que se associa a *TFEB* e funciona como um mecanismo de controle lisossomal e participa do processo de biogênese de lisossomos (Figura 3 B). (ZONCU et al., 2011; CORTEZ et al., 2015). Diversos trabalhos demonstram a atividade de *TFEB* como fundamental para o estabelecimento do parasita na célula hospedeira por meio de funções como exocitose de lisossomo (fagossomo e extracelular), reparo de membrana e autofagossomo (SARDIELLO et al., 2009; SETTEMBRE; BALLABIO, 2011; SPAMPANATO et al., 2013).

Recentemente outros trabalhos revelaram que durante a invasão celular pelo parasita, a célula promove a exocitose dos lisossomos liberando a enzima lisossomal esfingomielinase ácida (ASM) (KOVAL; PAGANO, 1991; FERNANDES;

CORTEZ; FLANNERY; TAM; MORTARA, R. A.; et al., 2011). A ASM cliva a foscoricolina da esfingomielina, um abundante esfingolípido presente na parte externa da membrana plasmática e induz à formação de outra molécula da membrana, a Ceramida (Figura 3 C). A Ceramida é responsável por remover a região lesionada e reparar a membrana (HOLOPAINEN et al., 2000; GULBINS; KOLESNICK, 2003a; BLITTERSWIJK, VAN et al., 2003; GRASSMÉ et al., 2007; TRAJKOVIC et al., 2008), esse processo facilita a invasão do parasita.

Células musculares são particularmente especialistas no processo de reparo de membrana durante a lesão da membrana plasmática. Durante o ciclo de vida de músculo estriado, o processo de reparação da membrana é essencial para a manutenção da integridade celular (GLOVER; BROWN, 2007). A degeneração de células do músculo pode levar à necrose do tecido, devido à substituição do músculo pelos tecidos fibroso e adiposo (HAN et al., 2007). Uma proteína que vem sendo associada à reparação da membrana de células musculares é a Disferlina (HAN et al., 2007). A Disferlina é uma proteína ancorada a membrana que está envolvida no reparo da membrana, sua ausência ou expressão reduzida está envolvida em doenças neuromusculares como a Miopatia de Miyoshi (MATSUDA et al., 2015). Em um papel direto a Disferlina pode permitir a sobrevivência de uma célula lesionada, o influxo de Ca^{+2} por meio de uma ruptura da membrana plasmática desencadeia a fusão de membranas mediada por disferlina selando a lesão (Figura 3 D) (BANSAL et al., 2003; LENNON et al., 2003a; MCNEIL; KIRCHHAUSEN, 2005; GLOVER; BROWN, 2007).

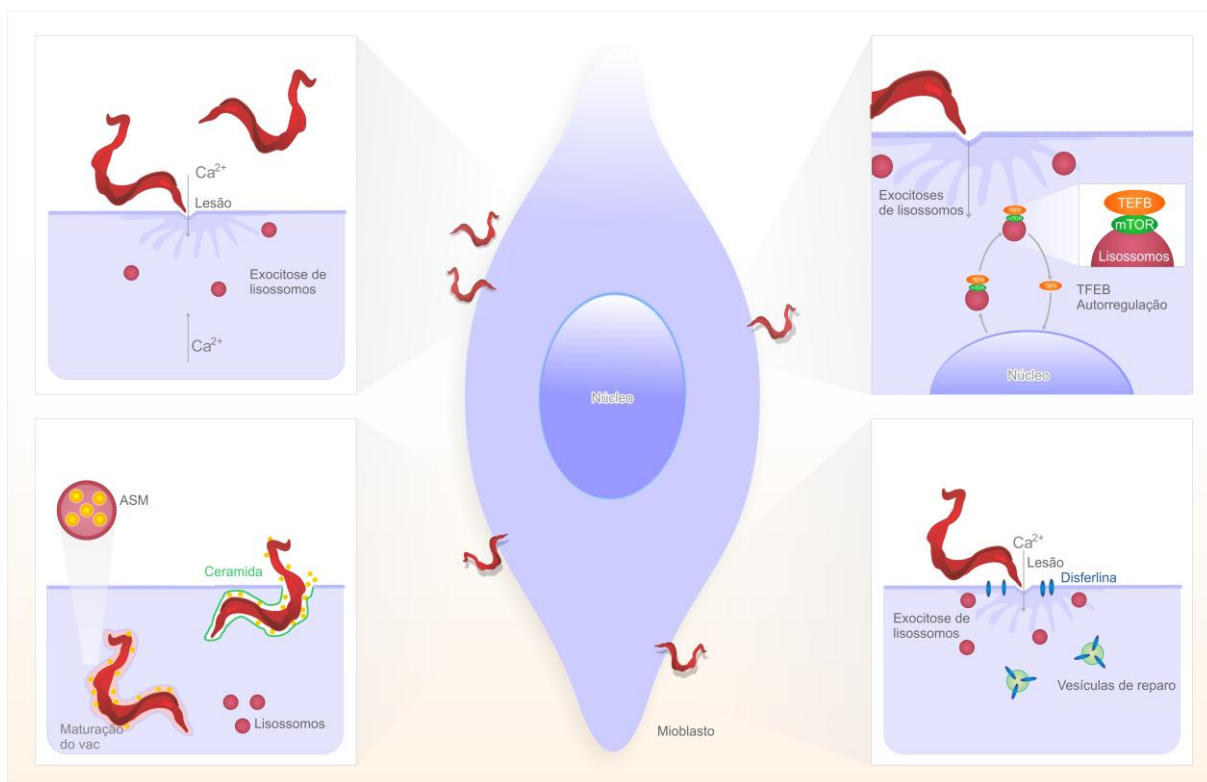


Figure 3: Esquema ilustrativo do processo de invasão por *T.cruzi* em mioblasto e a ação de cada proteína. (A) Processo de invasão celular por *Trypanosoma cruzi* promovendo lesão celular e influxo de cálcio; (B) TEFB sendo um regulador da exocitose de lisossomos (C) ASM enzima lisossomal utilizada para promover a síntese de ceramida, sendo importante para o processo de reparo de membrana durante a internalização do parasito. (D) Após a lesão a Disferlina também ajuda no processo reparo de membrana auxiliando assim na sobrevivência da célula.

1.3 GALECTINAS E ANEXINAS

As galectinas pertencem à família das lectinas, sendo proteínas que se ligam a carboidratos e podem reconhecer glicoproteínas, glicolípídeos e moléculas como lipídeos e proteínas, sendo encontradas em matriz extracelular, na superfície celular, no citoplasma e no núcleo (MENON; HUGHES, 1999; HOUZELSTEIN et al., 2004; FUNASAKA et al., 2014). As Galectina-1 (Gal-1) e Galectina-3 (Gal-3) estão envolvidas em diversos processos biológicos como adesão celular, sinalização intracelular, apoptose, regulação do ciclo celular e resposta imunológica (ZÚÑIGA et al., 2001; DUMIC et al., 2006; SALOMONSSON; CARLSSON; et al., 2010; SALOMONSSON; LARUMBE; et al., 2010; NOVAK et al., 2012). Alguns trabalhos correlacionaram a Gal-1 a eventos imunoregatórios frente à infecção por *T. cruzi*, sendo capaz de induzir a proliferação do parasito (ZÚÑIGA et al., 2001; CORREA et

al., 2003). Proteínas de superfície de *T. cruzi* interagem com a Gal-3, durante infecção ocorrendo um aumento da expressão dessa lectina e de seus ligantes, estudos demonstraram que a expressão de Gal-3 é importante para a adesão de tripomastigotas às células, e que com a ligação da Gal-3 à superfície do parasita e também à superfície de células musculares há um aumento das taxas de adesão (MOODY et al., 2000; VRAY et al., 2004; KLESHCHENKO et al., 2004).

As anexinas são proteínas ligantes de fosfolipídios e de F-actina sendo importantes em diversas respostas celulares (GERKE et al., 2005; TOBE, 2010; BANDOROWICZ-PIKULA et al., 2012).

A anexina-A2 (ANXA2) está relacionada com vias endocíticas, na reorganização da actina em eventos de internalização de patógeno e no tráfego de vesículas dependentes da polimerização de actina, eventos importantes para a internalização do parasito (HAYES, 2004; MOREL; GRUENBERG, 2008; LAW et al., 2009; GRIEVE et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2015). Outra anexina importante para vários processos celulares é a Anexina-A1 (ANXA1), quando ela é liberada da célula se liga ao seu receptor de superfície celular mediando a ação anti-inflamatória (GAVINS; HICKEY, 2012; KOSICKA et al., 2013).

De acordo com exposto, a Disferlina, o TFEB, e a ASM estão relacionadas ao reparo após uma lesão ou ruptura da membrana plasmática, enquanto as Anexinas e Galectinas estão envolvidas no rearranjo do citoesqueleto, adesão celular e resposta imunológica. O presente trabalho visou estudar se a expressão gênica dessas proteínas são alteradas durante a cinética de invasão por *T. cruzi* e qual o importância da via mTOR para internalização do parasita e modulação da Expressão gênica em células musculares C2C12 (mioblasto).

1.4 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão gênica de proteínas envolvidas no reparo de membrana celular e rearranjo do citoesqueleto de actina durante a infecção por *T. cruzi* em mioblastos murinos.

1.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a expressão dos genes Disferlina, Galectinas 1 e 2, Anexinas A1 e A2, TFEB e ASM durante a cinética de invasão por duas horas de *T. cruzi* em mioblastos da linhagem C2C12;
- Correlacionar a expressão dos genes com a carga parasitária durante a cinética de invasão;
- Verificar o impacto da inibição da via de mTOR sobre a expressão gênica destas proteínas e na carga parasitária durante duas horas de invasão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODO

LOCAL DO ESTUDO

Este estudo foi realizado na Universidade Federal de Uberlândia e os procedimentos experimentais foram conduzidos em sua maior parte no Laboratório de Tripanosomatídeos (Bloco 2B sala 200) do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU (ICBIM – UFU).

2.1 CÉLULAS PARA MANUTENÇÃO DO CICLO DE *T. CRUZI*

As células da linhagem Vero (fibroblastos de rim de macaco verde da África) foram utilizadas como hospedeiras para manutenção do ciclo de *T. cruzi in vitro*, foram cultivadas em garrafas de 25 cm² contendo 5 mL de meio contendo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's médium* - *Vitrocell/Embriolife*®), com L-glutamina (2 mM) e D-glicose (4500 mg/L), bicarbonato de sódio (2000 mg/L), HEPES (2380 mg/L), piruvato de sódio (1100 mg/L), suplementado com os antibióticos penicilina (60 mg/L), gentamicina (40 mg/L) e estreptomicina (10 mg/L), e com soro fetal bovino (*SFB* - *Vitrocell/Embriolife*) a 10%, e mantidas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

O repique dos parasitos foi realizado a cada 5 dias, após a formação de monocamada por meio da lavagem com Tampão Fosfato Salino (PBS), adição de 500 µL de Tripsina-EDTA (Tripsina 0,25% e EDTA 1 mM - *Vitrocell/Embriolife*®) e agitação leve para o total desprendimento das células, que eram então ressuspensas em 5 mL de meio DMEM suplementado. Para a contagem das células foi utilizando câmara de *Neubauer*. As células destinadas à infecção eram semeadas em garrafas de 75 cm² contendo 12 mL de meio de cultura suplementado. Após um tempo mínimo de 24 horas para a adesão das células, o meio de cultura celular era trocado para a retirada de células mortas e posteriormente infectada.

2.2 CEPA DE *Trypanosoma cruzi*

A cepa Y de *T. cruzi* utilizada no estudo foi isolada por SILVA; NUSSENZWEIG, (1953), por meio de xenodiagnóstico realizado em uma paciente

na fase aguda da infecção chagásica. A virulência dos parasitas da cepa Y foi mantida por meio de passagem regular em camundongos C57BL/6 heterogênicos, e foram recuperados por meio de sangria no pico da parasitemia (15 dias).

2.3 CULTURA DE CÉLULAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE INVASÃO

Mioblastos murino (C2C12) foram utilizados para os ensaios de invasão *in vitro*. Para isso foram cultivadas na presença de DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB - Vitrocell/Embriolife®) a 10%, e cultivadas em garrafas de 75 cm² contendo 12 mL de meio, mantidas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas e até atingirem a fase estacionária, mantidas em estado de subconfluência e repicadas a cada 2 ou 3 dias. Para a utilização das células nos ensaios foi feita a lavagem da cultura com salina tamponada com fosfatos (PBS), adição de 500 µL de Tripsina-EDTA (Tripsina 0,25% e EDTA 1 mM - Vitrocell/Embriolife®) e agitação leve para o total desprendimento das células, que eram então ressuspensas em 1 mL de meio DMEM suplementado e contadas utilizando câmara de *Neubauer*.

2.4 INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Camundongos machos C57BL/6 com 20 semanas, permaneceram no Biotério da UFU em ambiente controlado de 12 horas de luz e 12 horas no escuro, em temperatura de 25±2°C, recebendo água e ração *ad libitum*. A utilização dos camundongos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA), da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo número 059/08) PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 077/14. Os animais utilizados para passagem da cepa estavam pesando em média 23 g quando foram infectados com 100 µL de solução salina contendo 10⁵ formas tripomastigotas de *T. cruzi*, pela via intraperitoneal.

2.5 OBTENÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEOS PARA A INFECÇÃO DAS CÉLULAS VERO

A infecção inicial das células Vero foi feita a partir de formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Estas foram obtidas por meio da sangria intra-

orbital de camundongos infectados no pico da parasitemia. O sangue foi coletado e incubado na garrafa de cultura de VERO por 24 horas para a infecção das células. Em seguida, as garrafas foram lavadas com PBS para descartar as formas tripomastigotas que não invadiram e os eritrócitos remanescentes, por fim tiveram seu meio repostado.

2.6 CULTURA DAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS *IN VITRO*

As primeiras eclosões ocorreram por volta do décimo dia após a infecção, as formas tripomastigotas liberadas das células foram congeladas e/ou utilizadas na infecção de novas garrafas de cultura. Para isso, o sobrenadante de cultura das garrafas foi coletado em um falcon e centrifugado inicialmente a uma velocidade de 448 g (G-Force) por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro falcon e centrifugado novamente a uma velocidade de 1792 g durante 10 minutos. Posteriormente foi desprezado o sobrenadante e no *pellet* final continha os tripomastigota de cultura de tecidos (TCT).

2.7 DROGA INIBIDORA DA VIA DE SINALIZAÇÃO

Para o estudo dos processos celulares de transdução de sinais no presente estudo foi utilizado a Rapamicina/*Sirolimus* (Cayman®), inibidor da via de sinalização mTOR, solução estoque de 10 mg/mL, as células foram tratadas com 10 nM por duas horas. Após o tratamento o inibidor foi retirado lavando-se as células três vezes com PBS, em seguida incubamos ou não os parasitas para invadir por duas horas. Utilizamos formas TCT (50 parasitas/célula) da cepa Y de *T. cruzi*, foi analisado separadamente a internalização e a modulação da expressão gênica após a subversão da via mTOR.

2.8 ENSAIO DE INVASÃO EM MIOBLASTO

Neste ensaio foi utilizado mioblasto (C2C12) tratados ou não tratados e parasitas da cepa Y de *T. cruzi* para estudar o processo de internalização durante a cinética de invasão. Para isso células C2C12 foram retiradas da garrafa de cultura utilizando a tripsinização e plaqueadas em placas de polietileno de 24 poços

contendo lamínulas circulares de vidro, a uma concentração de 2×10^5 células/poço e ficaram incubadas *overnight* na estufa de CO_2 em DMEM suplementado com 10% de SFB, a $37^\circ C$ com 5% de CO_2 para completa aderência. No dia seguinte foi feita a lavagem do poço (3x) com PBS e posteriormente o meio foi repostado. No grupo tratado, após a lavagem as células foram tratadas com inibidor como descrito acima. Posteriormente às lavagens as células foram desafiadas com tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 minutos, 1 e 2 horas. Para isso, após ser feita a centrifugação diferencial, os parasitas foram contados e incubados com as células na proporção de 50 parasitas por célula. Para a sincronização os parasitas foram centrifugados a 1643 g por 1 minuto para normalizar o ensaio e após esse tempo foi iniciado a contagem dos tempos.

Após os tempos de incubação, os poços foram cuidadosamente lavados 3 vezes com PBS para a retirada de parasitas que não internalizaram, fixadas com solução *Bouin* por 15 minutos (73,4% de ácido pícrico, 23,8% de formaldeído e 4,8% de ácido acético) em temperatura ambiente, lavadas posteriormente e então coradas 40 minutos com *Giemsa* (6 gotas de corante para cada 1 mL de tampão fosfato). Para clarificação, as lamínulas foram submetidas à uma série de acetona/xilol (acetona 100% duas vezes, acetona 70% / xilol 30%, acetona 50% / xilol 50%, acetona 30% / xilol 70%, xilol 100% duas vezes), em seguida as lamínulas foram colocadas para secar ao ar livre. Após a secagem as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com uso de *Permunt* (*Interprise®*). Foi realizada a contagem da quantidade de parasitas internalizados a cada 100 células e as imagens foram adquiridas com o microscópio óptico de captura de imagem LEICA ICC50 HD.

2.9 ENSAIO DE INVASÃO PARA OBTENÇÃO DE RNA E DNA

Neste ensaio utilizamos mioblasto (C2C12) tratados ou não tratados e parasitas da cepa Y de *T. cruzi* para estudar o processo de invasão do parasita e a expressão gênica da célula frente à lesão mecânica causada pelo processo ativo de internalização do parasita. Para isso células C2C12 foram retiradas da garrafa de cultura por meio da tripsinização, plaqueadas em placas de polietileno de 6 poços a uma concentração de 10^6 células/poço e incubadas *overnight* na estufa de CO_2 em DMEM suplementado com 10% de SFB, a $37^\circ C$ com 5% de CO_2 para completa

aderência. No dia seguinte foi feita a lavagem do poço (3x) com PBS e posteriormente o meio foi repostado. No grupo tratado, após a lavagem as células foram tratadas inibidor como descrito anteriormente. Depois das lavagens as células foram desafiadas com tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 minutos, 1 e 2 horas. Para isso, após ser feita a centrifugação diferencial, os parasitas foram contados e incubados com as células em uma proporção de 50 parasitas por célula. Para uma melhor sincronização os parasitas foram centrifugados a uma velocidade de 1643 g por 1 minuto e após esse tempo foi iniciado a contagem dos tempos.

Após os tempos de incubação, os poços foram cuidadosamente lavados 3 vezes com PBS para a retirada de parasitas que não internalizaram. Para o controle do ensaio dos grupos tratados e não tratados foi feita a extração de RNA/DNA de mioblastos, todos os passos do ensaio foram realizados como descrito acima, com exceção de que para o controle as células não foram desafiadas com os tripomastigotas.

2.10 EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

Para a extração de DNA foi utilizado o *PureLink® Genomic DNA kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações e a qualidade do DNA foram determinadas a 260/280 nm em espectrofotômetro *NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer* (Thermo Scientific), e amostras com pureza ideal (~1,8) foram selecionadas.

Um par de iniciadores P21fw (5'-AACGCCACCATCAATCTTTTG -3'), P21rv (5'-CGTCGCATTCCTCATTCTTC-3') e a sonda P21p (5'-ACGCCATCGTCATGTGCGCAG -3'), foram desenhados utilizando a ferramenta *IDT PrimerQuest* (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>; San Diego, CA), posteriormente foram validados com as ferramentas *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, Bethesda, USA) e *Standart Nucleotide BLAST* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, Bethesda, USA) para confirmar

especificidade para a amplificação de um fragmento de 65 pares de bases de *Trypanosoma cruzi* (XM_812182.1).

Para as reações de qPCR, com um volume final de 12,5 μ L, foram adicionados 2 μ L (~ 50 ng) de DNA extraído e 0,4 μ M de cada iniciador (P21fw e P21rv). Foi feito o uso do reagente SYBR® *Green PCR Master Mix* (2X) (Applied Biosystems), contendo SYBR® *Green Dye AmpliTaq Gold®* DNA polimerase, dNTPs com dUTP, Rox referência passiva, tampão com componentes otimizados, e quando foi utilizado a sonda (0,2 μ M) usou-se o reagente *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas na plataforma ABI7300 (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 45 segundos e 72 °C durante 30 segundos. Após o alongamento final, as amostras foram submetidas à variação de temperatura de 50 a 95 °C, com aumento gradual de 0,5 °C / s para se obter a temperatura de fusão e produtos não específicos.

Para a quantificação do parasita primeiramente foi determinada uma curva padrão com diluições em série a partir de DNA extraído de 10^8 parasitas / mL de *T. cruzi* (correspondendo a uma diluição de 2×10^5 a 2×10^0 parasitas por ensaio). Para cada reação, o software SDS 7300 (Applied Biosystems) procurou o melhor ajuste entre os pontos, calculou e forneceu o coeficiente de regressão linear (R^2) e o *Slope* (inclinação da curva). O R^2 mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de *cycle threshold* (Ct) das amostras padrão (um valor de 1 indica uma juste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais). O *Slope* indica a eficiência da amplificação para o ensaio (um valor de 3,32 representa 100% de eficiência). A eficiência do ensaio entre 110 a 90% (*Slope*) e R^2 maior ou igual a 0,99 foram utilizados como parâmetros, tal como descrito como ideal (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

2.11 PCR CONVENCIONAL

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores P21fw (5'-AACGCCACC ATCAATCTTTTG -3'), P21rv (5'-CGTCGCATTCCTCATTTCTTC-3'), que resulta na amplificação de fragmento de 65 pares de base *T. cruzi*. (kDNA). A reação foi realizada em tubos de polipropileno de 0,2mL contendo 6,25 μ L de SYBR® *Green*

PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems), 0,4 µM de cada iniciador, e 50 ng de cDNA (volume total da reação de 13 µL). As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®). Foram usadas condições de ciclicização padrão, tal como recomendado pelo fabricante: 95 °C durante 10 min, (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) x 40 ciclos, e a análise da temperatura de fusão a 95 °C durante 15 segundos, em seguida 60 °C durante 1 min. As amostras foram visualizadas em gel de agarose a 2%.

2.12 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA), E TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DE PCR (RT-qPCR)

Para a extração de RNA, foi utilizado o *RiboZol™ Plus RNA Purification Kit* (Amresco), de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações e a qualidade do RNA foram determinadas a 260/280 nm em espectrofotômetro *NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer* (Thermo Scientific).

Para a reação da transcriptase reversa foi utilizado *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente foram utilizados 2 µg de RNA em um volume de 20 µL de reação, e a RT-PCR foi realizada em um termociclador (Techne® Endurance TC-312, UK). O protocolo iniciou-se em uma temperatura de 25 °C, mantida durante 10 min e seguido por 37 °C durante 120 min. Em seguida, as amostras foram aquecidas até 85 °C durante 5 min e, finalmente, 4 °C. O cDNA foi armazenado a -20 °C até o uso.

2.13 QUANTIFICAÇÃO GÊNICA RELATIVA POR PCR EM TEMPO REAL

Os iniciadores específicos para os genes em estudo (tabela 1) foram desenhados utilizando a ferramenta *IDT PrimerQuest* (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>; San Diego, CA), posteriormente foram validados com as ferramentas *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, Bethesda, USA) e *Standart Nucleotide BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?>

[PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome](#), Bethesda, USA) para confirmar especificidade.

A quantificação gênica relativa foi determinada na plataforma ABI 7300 (Applied Biosystems) e os dados recebidos foram processados usando o *Software* v1.4.1 SDS (Applied Biosystems). Cada reação continha 6,25 µL de *SYBR® Green PCR Master Mix* (2X) (Applied Biosystems), 0,4 µM de cada iniciador, e 50 ng de cDNA (volume total da reação de 13 µL). Foram usadas condições de ciclização padrão, tal como recomendado pelo fabricante: 95 °C durante 10 min, (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) x 40 ciclos, e a análise da temperatura de fusão a 95 °C durante 15 segundos, em seguida 60 °C durante 1 min. Cada reação de PCR foi realizada em triplicada, e controles sem cDNA foram incluídos. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Além disso, a análise da temperatura de fusão foi realizada em cada ensaio, a fim de detectar a amplificações inespecíficas.

Os níveis relativos de expressão gênica foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ grupo infectado (alvo do gene Ct - endógena do gene Ct) - grupo não infectado ΔCt (gene alvo Ct - Ct do gene endógeno) (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). O GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como gene de referência (endógeno).

Os valores extremos não foram incluídos na análise estatística.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para a análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

| Gene | Sequencia (5'-3') | Tamanho do Fragmento (pb) | Temperatura de Anelamento (°C) | Sequencia de Referência (RefSeq) |
|-------------|---|---------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| ANEXINA A1 | CAACCATCATTGACATTCTTACCAA TGTAAGTACGCGCCTTGATC | 70 | 59 | NM_010730.2 |
| ANEXINA A2 | GGATCACCCAGAAGTGGCTCTA TCCATTAGTGGAGAGCGAAGTCT | 70 | 59 | NM_007585.3 |
| GALECTINA 1 | GCCAGACGGACATGAATTCA CGCCGCCATGTAGTTGATG | 67 | 58 | NM_008495.2 |
| GALECTINA 3 | CCACTGACGGTGCCCTATG CACTGTGCCCATGATTGTGATC | 78 | 59 | NM_001145953.1 |
| DISFERLINA | AGGCGCCCCGATACTTCT CGTCGCCACAAGATGAACTTC | 71 | 58 | AF188290.2 |
| TFEB | CTCAGTGGTCTTGGGCAAATC GCATAAGTATGGTTGCTCCCATT | 77 | 58 | AF079095.1 |
| ASM | AGGGCTCGAGAAACCTATGGA TCATGCGGTAGACCAGGTTGT | 70 | 59 | AK145534.1 |
| GAPDH | CAAGGACACTGAGCAAGAGAG GGGTCTGGGATGGAAATTGT | 82 | 62 | NM_008084.2 |

2.14 NORMAS DE BIOSSEGURANÇA

Todo procedimento *in vitro*, envolvendo manuseio dos parasitos, do cultivo de células infectadas e de reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2005).

2.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata, três experimentos independentes cada um com três réplicas. As internalizações foram analisadas pelo One-way ANOVA, “Post test” Bonferroni. As expressões relativas foram analisadas pelo teste *Kruskal Wallis*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunnett*, e foi realizada utilizando *GraphPad Prism* versão 6.00 para *Windows*, *GraphPad*

Software, La Jolla, Califórnia, EUA. O nível de significância foi estabelecido quando $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 DESENHO DOS INICIADORES

Para o início da construção dos iniciadores, a sequência do DNA e as sequências dos transcritos (mRNAs) foram analisadas utilizando o programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Diversos critérios foram utilizados para a construção dos iniciadores incluindo anelamento em junção de éxon (quando possível), formação de estruturas secundárias, conteúdo GC e temperatura de *melting* (TM). Na tabela 2 estão os resultados da validação dos primers para os genes do estudo, todos os primers utilizados permaneceram dentro dos padrões exigidos para uma reação de RT-qPCR, assim como o valor R^2 de 99%.

Tabela 2: Validação dos primers para os genes de Galectina-1, Galectina-3, Anexina-A1, Anexina-A2, Disferlina, TFEB e ASM.

| GENE | SLOPE* | EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO | R^2 | EFICIÊNCIA DOS PRIMERS (%) |
|-------------|--------|----------------------------|-------|----------------------------|
| ANEXINA A1 | -3,3 | 2,0 | 0,99 | 100 |
| ANEXINA A2 | -3,4 | 1,9 | 0,99 | 96 |
| GALECTINA 1 | -3,3 | 2,0 | 0,99 | 100 |
| GALECTINA 3 | -3,5 | 1,9 | 0,99 | 93 |
| DISFERLINA | -3,2 | 2,0 | 0,99 | 105 |
| TFEB | -3,5 | 1,9 | 0,99 | 93 |
| ASM | -3,5 | 1,9 | 0,99 | 93 |
| GAPDH | -3,1 | 2,1 | 0,99 | 110 |

*Primers com padrões aceitáveis com relação ao Slope segundo a Applied Biosystem. R^2 coeficiente de correlação linear.

3.2 ESPECIFICIDADE DO PRIMER PARA QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A figura 4 .A , representa a curva padrão utilizada para detecção de da carga parasitaria das amostras. O valor da Temperatura de *melting* obtido na reação para a curva de dissociação do fragmento amplificado foi de 78 °C (Figura 4-B). O R^2 da curva padrão foi igual a 0,99, cuja a inclinação da reta (*Slope*) foi de -3,3 e eficiência do PCR de 100%. (Figura 4-C).

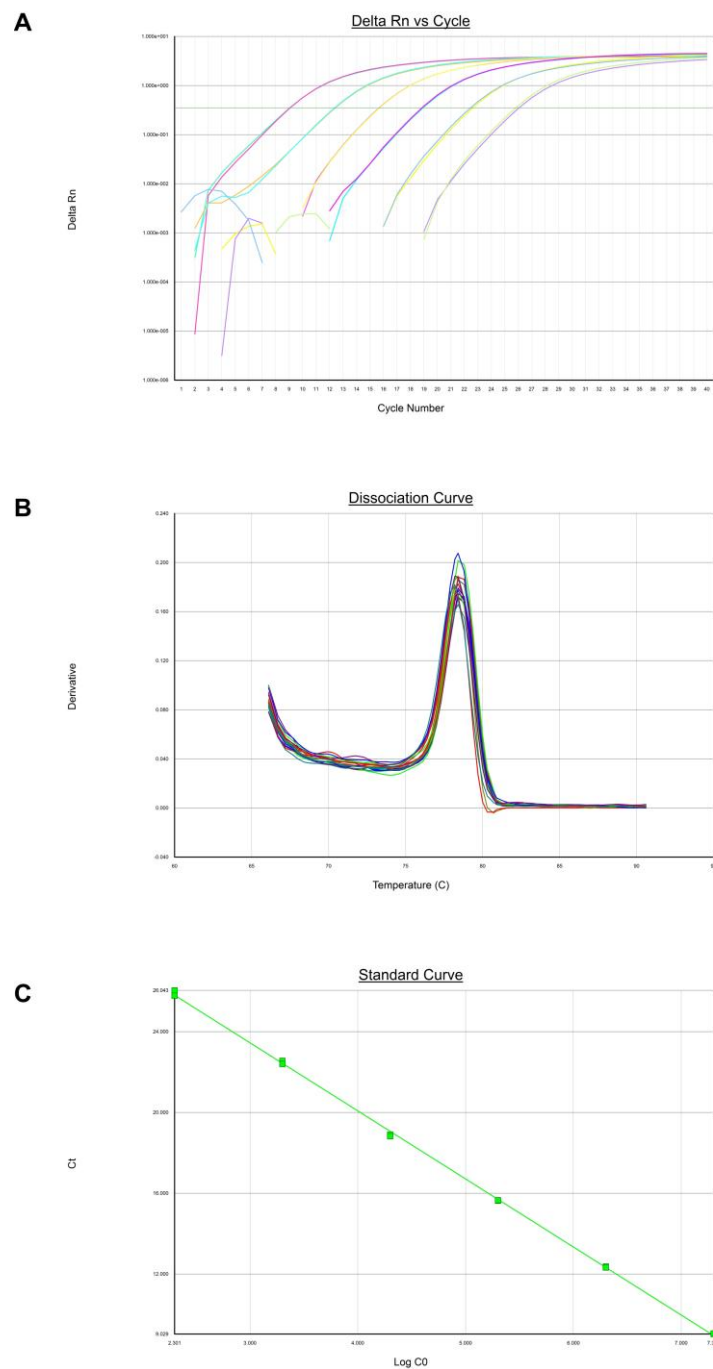


Figura 4: Especificidade da primer P21. Reação de PCR em tempo real para amplificação do DNA de *T. cruzi*. Gráfico de amplificação da curva padrão com diluições de 10^5 a 10^0 com a amplificação de 10^5 no ct ~9 e o 100 no ct 26 (A). Curva de dissociação com $T_m = 78$ °C para o fragmento amplificado com a p21 (B). Coeficiente de correlação linear (R^2) da curva padrão igual a 0,99, inclinação da reta (Slope) de -3,3 e eficiência do PCR de 100% (C).

3.3 TESTE DOS PRIMERS PARA QUANTIFICAÇÃO DO DNA

O PCR convencional foi feito para verificar a especificidade dos primers com a relação às amostras positivas. Deste modo verificou-se que o primer P21 foi

específico para as amostras de mioblastos infectados com *T. cruzi*, ficando claramente observado que as amostras controles não amplificarão (mioblastos não infectados) (Figura 5).

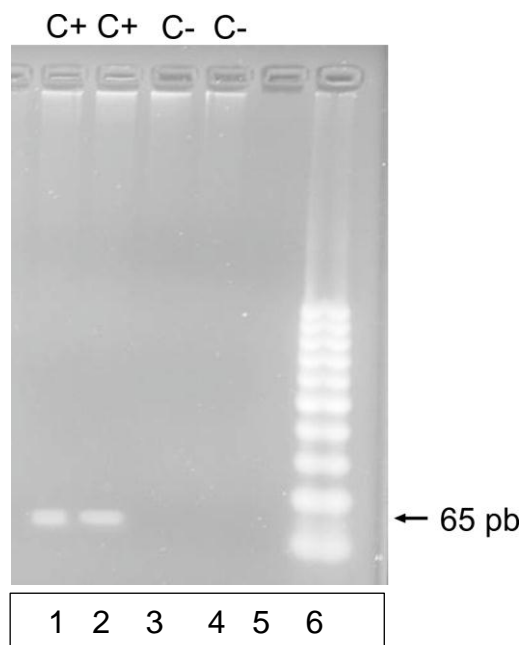


Figura 5: Especificidade do primer P21 em Gel de agarose. A seta mostra o fragmento de 65 pb amplificado pelo par de iniciadores P21 submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. Linha 1 e 2 são amostras positivas, as linhas 3 e 4 amostras controle negativo e linha 6, padrão de peso molecular de 50pb. O gel é representativo da PCR qualitativa para *T. cruzi*.

3.4 ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS UTILIZADOS NO RT-qPCR MEDIANTE A CURVA DE DISSOCIAÇÃO

A especificidade dos oligonucleotídeos foi verificada pela curva de dissociação gerada posteriormente a reação de RT-qPCR. Os diversos picos obtidos com primers utilizados neste estudo podem ser observados na figura 6 (A-G). A análise das curvas não exibiram outros picos, sugerindo que os oligonucleotídeos produzem um único fragmento de PCR, ou seja, a amplificação foi específica.

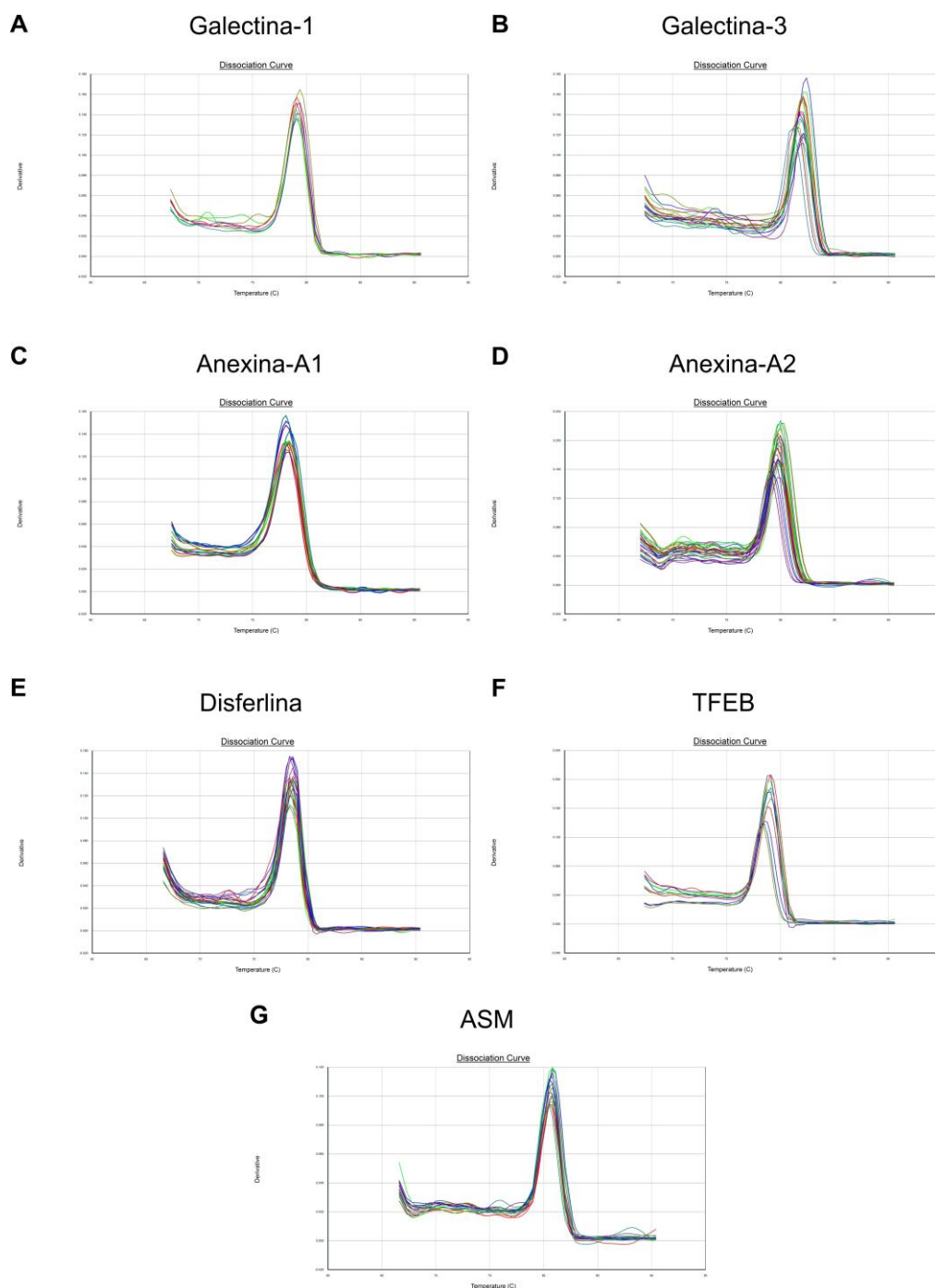


Figura 6: Curva de dissociação gerada pela RT-qPCR. Picos obtidos na curva de dissociação ou “Curva de Melt” gerada pelo RT-qPCR; Galectina-1 (A); Galectina-3 (B); Anexina-A1 (C); Anexina-A2 (D); Disferlina (E); TEFB (F) e ASM (G). Picos únicos demonstram especificidade para cada amplificação.

3.5 ANÁLISE DA QUALIDADE DO DNA E DO RNA

O valor do rendimento do DNA e mRNA total adquirido a partir das amostras analisadas foram calculados avaliando a média de três leituras de cada amostra.

Todas as amostras tiveram um excelente rendimento e apresentaram ótimos valores considerados aceitáveis para a razão 260/280 e 260/230, as amostras que não foram satisfatórias em relação ao rendimento e purezas foram descartadas.

3.6 CARGA PARASITÁRIA FOI MAIOR NOS TEMPOS POSTERIORES DA CINÉTICA DE INFECÇÃO EM MIOBLASTO.

Nosso primeiro objetivo foi verificar a carga parasitaria em mioblastos infectados ao longo da cinética de invasão (5, 10, 15, 20, 30, 45 minutos, 1 e 2 horas), na figura 7 (A-H) observamos por meio das imagens o aumento gradual da internalização parasitária nas células C2C12. Contamos por meio de um microscópio óptico o número de parasitas internalizados a cada 100 células (Figura 7I), e quantificamos também a internalização por meio do qPCR (Figura 7J), este ensaio deixou bem evidente que durante a cinética de invasão a quantidade de parasitas que internalizaram nos mioblastos foi maior nos tempos de 1 e 2 horas. Os resultados foram similares entre os dois métodos (Figura 7 I-J).

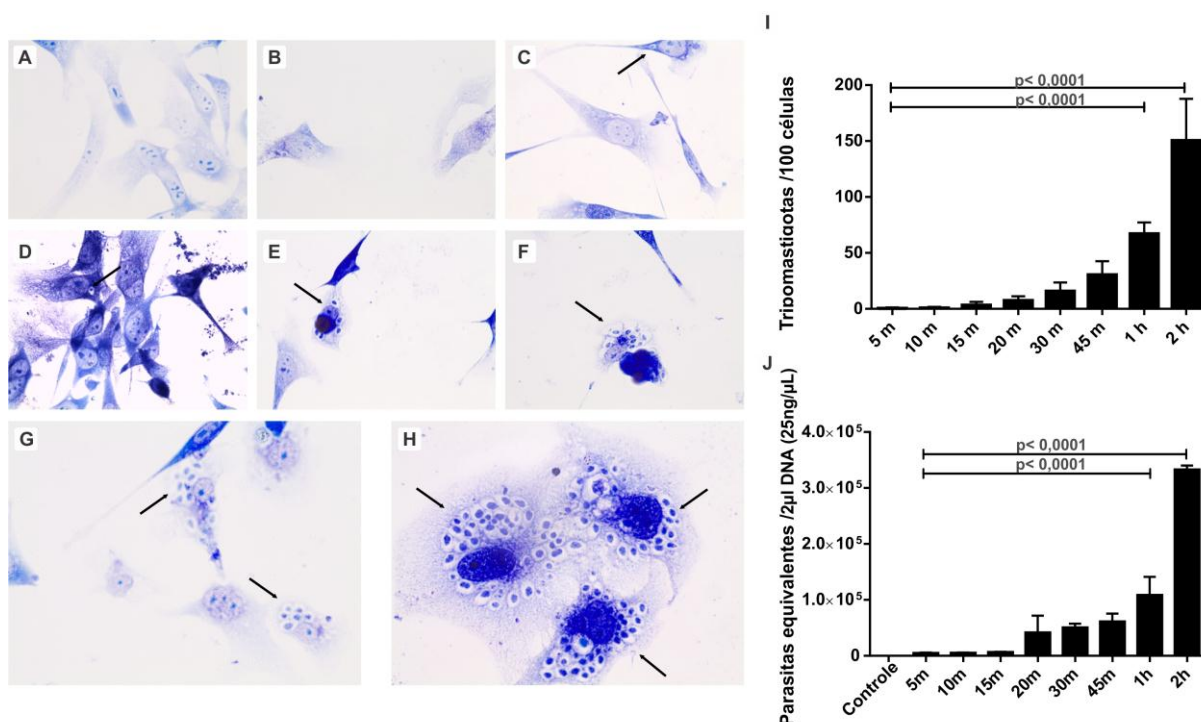


Figura 7: Cinética da internalização de *T. cruzi* em mioblasto. (A) 5 minutos, (B) 10 minutos, (C) 15 minutos, (D) 20 minutos, (E) 30 minutos, (F) 45 minutos no aumento de 20X, (G) 1 hora e (H) 2 horas no aumento de 40X. (I) Quantificação do número de parasitas interiorizados observados em microscopia óptica. (J) Carga parasitária determinada por qPCR. As setas indicam os parasitas internalizados, as imagens foram obtidas com o microscópio óptico de captura de imagem LEICA ICC50 HD. As imagens são representativas de três experimentos realizados independentemente. Os valores de p representam as diferenças significativas.

3.7 A INFECÇÃO DE *T. cruzi* EM MIOBLASTO INDUZ O AUMENTO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TFEB, DISFERLINA, E ASM NOS TEMPOS POSTERIORES DA CINÉTICA DE INVASÃO.

Foram avaliadas as expressões gênicas durante a cinética invasão e houve variações significativas nas expressões de Gal-1, Gal-3, ANXA1 e ANXA2, quando comparado com os outros grupos (Figura 8-A, B, C e D). Um aumento significativo foi observado no gene da Disferlina nos tempos de 45 minutos a 2 horas de infecção (Figura 8 E). Verificamos também um aumento significativo da expressão gênica do fator de transcrição TFEB e de ASM nos tempos de 1 e 2 horas após a infecção em comparação com o controle (Figura 8 F-G).

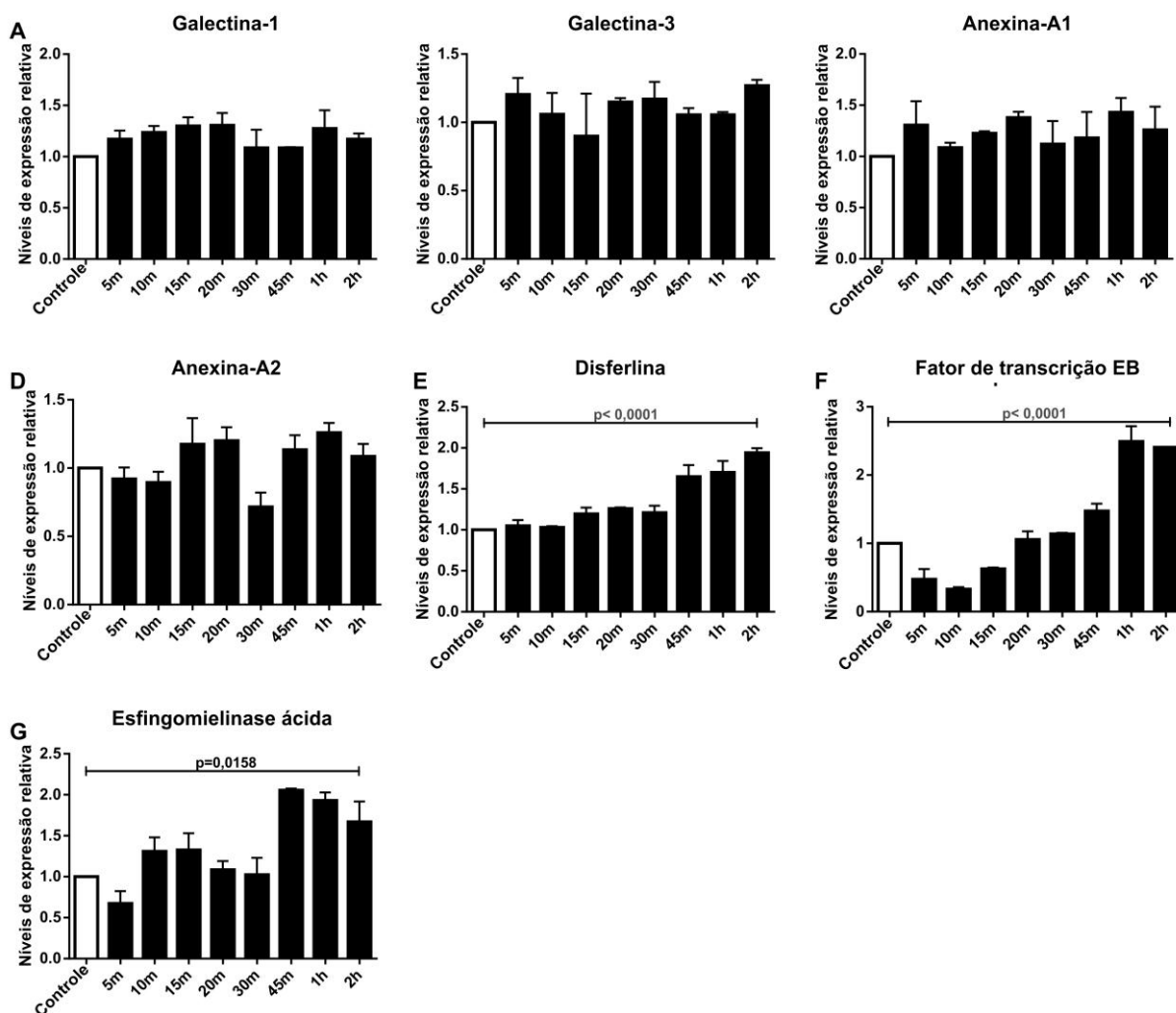


Figura 8: Expressão gênica na cinética de invasão. (A) Galectina-1, (B) Galetina-3, (C) Anexina-A1, (D) Anexina-A2, (E) Disferlina, (F) TFEB, e (G) ASM, durante a cinética de invasão. Os valores de p representam as diferenças significativas. Os dados são representados pela média \pm desvio padrão de três experiências realizadas independentemente.

3.8 A INIBIÇÃO DA MTOR PROMOVE A DIMINUIÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO EM MIOBLASTOS

Para avaliar o impacto na infecção de *T. cruzi* em mioblasto após a inibição da via de sinalização do mTOR, as células foram previamente tratadas com Rapamicina. Verificamos que após o tratamento com o inibidor o número de parasitas internalizados em mioblasto reduziu significativamente em relação ao grupo não tratado (Figura 9). Observamos por meio das imagens a diminuição da internalização parasitária nas células C2C12 (Figura 9 A-B). Quantificamos por meio de um microscópio óptico o número de parasitas internalizados a cada 100 células

(Figura 9-C), e quantificamos também a internalização por meio do RT-qPCR (Figura 9-D).

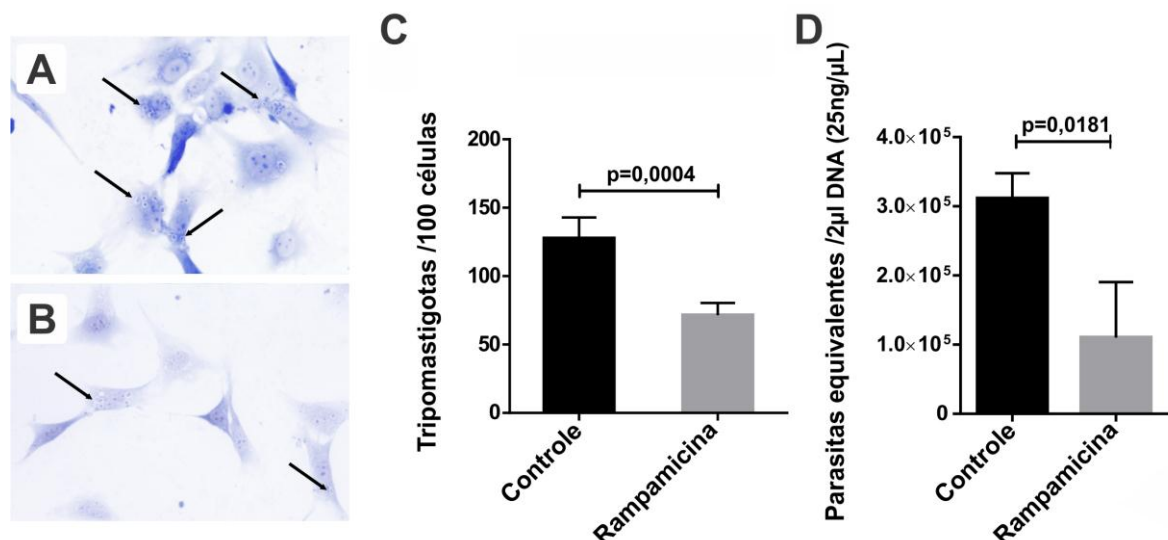


Figura 9: Taxa da inibição da internalização de *T. cruzi* em mioblasto após tratamento com Rampamicina. (A) Mioblastos não tratados Rampamicina. (B) Mioblastos tratados com Rampamicina no aumento de 20X. (C) Número de parasitas internalizados a cada 100 células. (D) Carga parasitária determinada por q-PCR (D). As imagens obtidas por microscopia óptica de captura são representativas de três experimentos realizados independentemente. As setas indicam os parasitas internalizados. Os dados são representados pela média \pm desvio padrão de três experimentos realizados independentemente. Os valores de p representam as diferenças significativas.

3.9 TRATAMENTO COM RAPAMICINA ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA DE ANEXINA A2, TFEB E ASM DURANTE A INFECÇÃO DE MIOBLASTO.

A expressão gênica da Gal-1, Gal-3, ANXA1, ANXA2, Disferlina, ASM e TFEB em mioblasto pré-tratado com Rampamicina ou não, desafiados ou não com *T. cruzi* foram analisadas por RT-qPCR. Os genes expressões em grupos pré-tratados ou não e infectados foram avaliados depois de duas horas de invasão (Figura 10). Não houve alterações significativas na expressão gênica da Gal-1, Gal-3 e ANXA1 (Figura 10 A, B e C). No que diz respeito à ANXA2 (Figura 10 D) observamos que a inibição da via de sinalização de mTOR promoveu uma diminuição na expressão do gene em mioblastos tratados e infectados em comparação com os outros grupos. Analisando a expressão do gene da Disferlina (Figura 10 E) observamos um aumento significativo na expressão deste gene em mioblastos tratados e infectados quando comparados com o grupo de mioblastos tratados e não infectados. Verificamos também uma diminuição significativa da

expressão de TFEB em mioblastos tratados e infectados em relação ao grupo de mioblastos infectados, demonstrando que o tratamento com Rampamicina pode influenciar na ativação da transcrição gênica, não houve diferenças estatísticas em relação aos demais grupos (Figura 10 F). A expressão do gene de ASM (Figura 10 G) foi menor nas células tratadas e infectadas, em comparação com mioblastos não tratadas e infectadas.

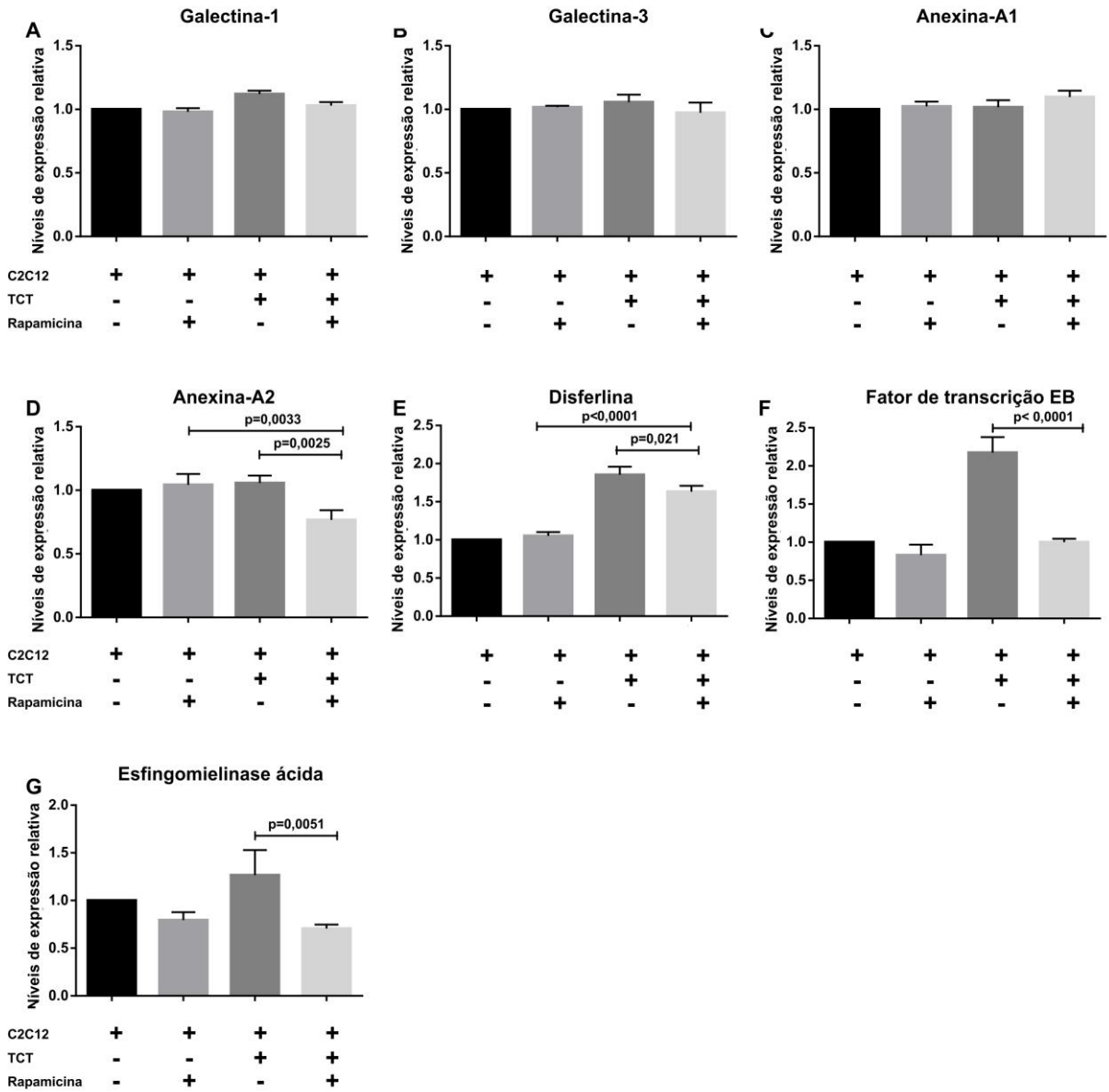


Figura 10: Modulação da expressão gênica em mioblasto após a tratamento com Rampamicina e infecção por *T. cruzi*. (A) Galectina-1, (B) Galectina-3, (C) Anexina-A1, (D) Anexina-A2, (E) Disferlina, (F) TFEB e (G) ASM. Os dados são representados pela média \pm desvio padrão de três experimentos realizados independentemente. Os valores de p representam as diferenças significativas.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

A invasão de *Trypanosoma cruzi* em linhagens de células não musculares imita um processo de lesão e reparo na membrana plasmática, que envolve a exocitose de lisossomos dependentes de Ca^{2+} , a entrega de esfingomielinase ácida (ASM) para o folheto exterior da membrana plasmática, e uma forma de endocitose rápida que interioriza lesões da membrana (FERNANDES et al., 2011). ASM cliva o grupo fosforilcolina da cabeça da esfingomielina, um esfingolípido abundante no folheto externo da membrana plasmática (KOVAL; PAGANO, 1991), gerando a ceramida que tem propriedade de coalescência da membrana formando domínios de brotamento que são internalizados (HOLOPAINEN et al., 2000; GULBINS; KOLESNICK, 2003; BLITTERSWIJK, VAN et al., 2003; GRASSMÉ et al., 2007; TRAJKOVIC et al., 2008).

Nossos resultados mostraram um aumento da expressão da ASM pela infecção de *T. cruzi* em C2C12, dessa forma estão de acordo com trabalhos anteriores e fornecem evidências para propor que a ASM também pode ser expressa durante a invasão do parasita em células musculares.

Vários estudos demonstraram a atividade de TFEB como chave para o estabelecimento do parasita na célula hospedeira através de funções tais como reparo da membrana plasmática, exocitose lisossomal, formação do fagossomo e autofagossomo (SARDIELLO et al., 2009; SETTEMBRE et al., 2011; SPAMPANATO et al., 2013).

Observamos também em nosso trabalho que durante a cinética da infecção por *T. cruzi* houve um aumento da expressão gênica da Disferlina, que de acordo com estudos anteriores está diretamente relacionada ao reparo de membrana (BANSAL et al., 2003; LENNON et al., 2003a; MCNEIL; KIRCHHAUSEN, 2005; GLOVER; BROWN, 2007), e quando a via mTOR foi inibida em nosso trabalho houve um decréscimo dessa expressão. Neste contexto, as expressões da Disferlina, TFEB e ASM podem exercer um papel fundamental durante a reparação da membrana plasmática de uma forma dependente da ativação da via de sinalização m-TOR.

A expressão das Anexinas-A1 e A2 e as Galectinas-1 e 3 não foram significativas em nenhum dos tempos em nosso estudo. Alguns estudos

demonstraram que as Anexinas A1 e A2 podem ligar-se diretamente à Disferlina, culminando em um grande complexo de reparação da membrana (LENNON et al., 2003b; ROOSTALU; STRÄHLE, 2012). Acreditamos que a lesão causada pela invasão celular pelo parasita em nosso estudo não foi o suficiente para estabelecer essa superexpressão das Anexinas A1 e A2, ou possivelmente poderia ser elevada se o tempo da cinética avaliada fosse maior. Estudos complementares devem ser realizados para a validação do mesmo. Em um estudo sobre galectina-1 (Gal-1), a infecção pelo *T. cruzi* induziu um aumento precoce da expressão gênica de Gal-1 *in vivo*, enquanto que houve uma diminuição da mortalidade dos camundongos e menor carga parasitária no tecido muscular avaliado (PONCINI et al., 2015). BENATAR et al. (2015), demonstraram que a exposição de cardiomiócitos (HL-1) à Gal-1 reduziu o percentual de infecção por duas cepas de *T. cruzi* diferentes. Em relação à Galectina-3, estudos anteriores demonstraram que a galectina-3 está envolvida no processo de adesão dos tripomastigotas e internalização celular sua presença em torno vacúolo parasitóforo (REIGNAULT et al., 2014) e em torno de parasitas após a sua fuga do vacúolo parasitóforo (MACHADO et al., 2014). Assim, Galectina 1 e Galectina 3 parecem ser importantes na relação hospedeiro-parasita na infecção de *T. cruzi*. Porém, os dados aqui apresentados foram insuficientes para estabelecer uma correlação clara entre o papel da Gal-1 e 3 na infecção com a indução de sua expressão gênica durante a cinética de invasão pela cepa Y de *T. cruzi* em mioblastos. Desse modo, avaliações posteriores serão conduzidas no sentido de compreender melhor essa interação. Como mencionado anteriormente, a invasão por *T. cruzi* em células musculares envolve a participação de componentes do parasita e hospedeiro, e de vários eventos de transdução de sinal, tendo em consideração as várias especificidades não só do parasita, mas também do tipo de célula hospedeira utilizada nos ensaios. Qualquer tipo de linhagem e células estudadas têm diferentes estratégias de invasão que podem causar diferentes respostas celulares e seus próprios eventos de sinalização (SOUZA, DE et al., 2010; HENAO-MARTÍNEZ et al., 2015). Neste contexto, o presente estudo analisou a importância do mTOR na regulação gênica, e na invasão celular, após a via inibida. A importância da via de sinalização de mTOR nas interações parasita-hospedeiro e também no processo de internalização ainda não é muito clara. Nossos resultados mostram que esta via foi necessária durante a invasão por TCT da cepa Y em

mioblastos de murino. De acordo com MAEDA et al., (2012) a via de mTOR está ativada na invasão de formas tripomastigotas metacíclicas de modo dependente de algumas glicoproteínas na de superfície do parasita, como gp82 e a gp30, sendo esta última relacionada à liberação de Ca^{2+} e exocitose de lisossomos através da ativação da via PI3K/mTOR/PKC. Romano et al. (2009), estudando a relação entre a via autofágica e a invasão de *T. cruzi*, induziram autofagia em células hospedeiras usando o inibidor de mTOR (Rapamicina) e mostraram que houve um aumento na internalização de formas TCT das cepas CL e RA de forma dependente dos lisossomos. Um estudo recente (CORTEZ et al., 2015) demonstrou que após o tratamento e infecção celular a internalização de TCT foi aumentada, porém diferente do nosso trabalho, eles usaram células HeLa para os experimentos. MARTINS et al.(2011), tiveram um resultado diferente de ROMANO et al. (2009) e CORTEZ et al. (2015), eles demonstraram que a internalização de TCT de *T. cruzi* da cepa CL poderiam ser aumentadas em condições de estresse nutricional e indução da via autofágica, mas foi prejudicada quando as células hospedeiras foram tratadas com inibidor de mTOR (Rapamicina) em todas as concentrações testadas. Porém quando estenderam sua análise à cepa G do parasita, a qual é geneticamente divergente da cepa CL, observaram que TCT desta cepa tiveram sua internalização reduzida nas células hospedeiras tratadas com Rapamicina. Em nosso trabalho verificamos que a invasão de TCT em mioblastos foi reduzida após 2 horas de invasão. Acreditamos que essa diferença entre os trabalhos é devido aos diferentes modelos experimentais usados, levando em consideração as diferenças das linhagens celulares e cepas utilizadas em cada estudo. Verificamos também, após a inibição por Rapamicina que a expressão de TFEB, ASM e Anexina A2 estavam significativamente menores.

Em um estudo recente, o tratamento de células com rapamicina, que induz a desfosforilação de mTOR (inibição da via), diminui o acúmulo de lisossomos perinucleares e a translocação nuclear de TFEB (regulador de biogênese lisossomal) o que acarreta uma diminuição na internalização por tripomastigotas metacíclicos (TM), porém favorece a internalização por tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) (CORTEZ et al., 2015). No nosso estudo a expressão de TFEB e ASM foi inibida pelo tratamento com Rampamicina, sugerindo que a biogênese lipossomal pode ter sido comprometida e com isso a função de reparação lisossomal também pode ter

danificada. A expressão gênica de Disferlina continuava mais elevada mesmo após o tratamento, mostrando que sua transcrição não foi comprometida, sugerindo que sua função de reparação ainda estava preservada. Nossos resultados mostraram uma queda na expressão gênica de Anexina A2. Alguns estudos demonstraram a importância da Anexina A2 na relação parasita-hospedeiro. Teixeira et al., (2015) demonstraram que as células *knockout* para Anexina A2 apresentaram uma redução significativa na invasão de células por amastigotas extracelulares (AE), porém favoreceram a sua multiplicação. Outro estudo demonstrou que a Anexina A2 está envolvida na remodelação da actina (GRIEVE et al., 2012). Neste contexto, a falta de expressão de Anexina A2 pode ter desorganizado o citoesqueleto de actina, o que permitiu maior multiplicação do parasita nas células *knockout* em comparação com as do tipo selvagem. Por conseguinte, MOTT et al., 2009 sugeriram que a remodelação rápida do citoesqueleto, antes intacto e rígido, favorece o estágio inicial da invasão por *T. cruzi*, e que uma posterior desorganização do citoesqueleto favorece a replicação intracelular ou a saída do parasita da célula.

Em nosso estudo não foi possível correlacionar a inibição de mTOR e a diminuição da expressão de Anexina A2, sendo necessário outros estudos para elucidar esta relação.

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

De acordo com nossos resultados concluímos que a expressão gênica de TFEB, ASM, Disferlina e dados da literatura podem propor o seguinte cenário: Durante a invasão celular por tripomastigotas, o parasita subverte os mecanismos de reparo de membrana celular por meio da ativação da via de sinalização de cálcio intracelular e da via da mTOR. Com a ativação da mTOR, ocorre a migração de TFEB para o núcleo da célula onde este fator promove a expressão gênica de ASM que por sua vez facilitarão e promoverão a exocitose lisossomal, culminando com a invasão celular. Embora não haja dados na literatura, podemos sugerir que a translocação de TFEB para o núcleo celular após a interação *T.cruzi*-célula muscular também promove a expressão genica de Disferlina.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. J. M.; MORTARA, R. A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl , p. 76–88, 2009.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 9, p. 1135–43, 2004.
- ANDREWS, N. W. Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. **The Journal of cell biology**, v. 158, n. 3, p. 389–94, 2002.
- ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, G. A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: Evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1277–1287, 1990.
- ARAÚJO, A.; JANSEN, A. M.; REINHARD, K.; FERREIRA, L. F. Paleoparasitology of Chagas disease: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 9–16, 2009. Fundação Oswaldo Cruz.
- BANDOROWICZ-PIKULA, J.; WOS, M.; PIKULA, S. Do annexins participate in lipid messenger mediated intracellular signaling? A question revisited. **Molecular membrane biology**, v. 29, n. 7, p. 229–42, 2012.
- BANSAL, D.; CAMPBELL, K. P. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. **Trends in cell biology**, v. 14, n. 4, p. 206–13, 2004.
- BANSAL, D.; MIYAKE, K.; VOGEL, S. S.; et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. **Nature**, v. 423, n. 6936, p. 168–72, 2003.
- BENATAR, A. F.; GARCÍA, G. A.; BUA, J.; et al. Galectin-1 Prevents Infection and Damage Induced by *Trypanosoma cruzi* on Cardiac Cells. (A. Rodriguez, Ed.) **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004148, 2015.
- BHATTACHARYYA, T.; BROOKS, J.; YEO, M.; et al. Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. **International journal for parasitology**, v. 40, n. 8, p. 921–8, 2010.
- BLITTERSWIJK, W. J. VAN; LUIT, A. H. VAN DER; VELDMAN, R. J.; VERHEIJ, M.; BORST, J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? **The Biochemical journal**, v. 369, n. Pt 2, p. 199–211, 2003.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual review of microbiology**, v. 27, p. 347–82, 1973. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- CAMPOS DE CARVALHO, A. C.; GOLDENBERG, R. C. S.; JELICKS, L. A.; et al. [Not Available]. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2009, p. 484358, 2009.
- CARVALHO, T. U. DE; SOUZA, W. DE. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 205–212, 1986.

- CEVALLOS, A. M.; HERNÁNDEZ, R. Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. **BioMed research international**, v. 2014, p. 401864, 2014.
- CHENG, X.; ZHANG, X.; YU, L.; XU, H. Calcium signaling in membrane repair. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 45, p. 24–31, 2015.
- CORREA, S. G.; SOTOMAYOR, C. E.; AOKI, M. P.; MALDONADO, C. A.; RABINOVICH, G. A. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. **Glycobiology**, v. 13, n. 2, p. 119–28, 2003.
- 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. **Cellular microbiology**, 2015.
- COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, p. 6–7, 2010.
- DEFOUR, A.; MEULEN, J. H. VAN DER; BHAT, R.; et al. Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. **Cell death & disease**, v. 5, p. e1306, 2014.
- DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1760, n. 4, p. 616–35, 2006.
- FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: A unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 734–747, 2012.
- FERNANDES, M. C.; CORTEZ, M.; FLANNERY, A. R.; TAM, C.; MORTARA, R. A.; et al. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 5, p. 909–921, 2011.
- FERNANDES, M. C.; CORTEZ, M.; FLANNERY, A. R.; TAM, C.; MORTARA, R. A.; et al. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 5, p. 909–21, 2011.
- FUNASAKA, T.; RAZ, A.; NANGIA-MAKKER, P. Nuclear transport of galectin-3 and its therapeutic implications. **Seminars in cancer biology**, v. 27, p. 30–8, 2014.
- GARCIA-SILVA, M. R.; CABRERA-CABRERA, F.; NEVES, R. F. C. DAS; et al. Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves. **BioMed research international**, v. 2014, p. 305239, 2014.
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 22–7, 2010.
- GAVINS, F. N. E.; HICKEY, M. J. Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 354, 2012.
- GERKE, V.; CREUTZ, C. E.; MOSS, S. E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 6, p. 449–61, 2005. Nature Publishing Group.

- GLOVER, L.; BROWN, R. H. Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, v. 8, n. 7, p. 785–94, 2007.
- GRASSMÉ, H.; RIETHMÜLLER, J.; GULBINS, E. Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. **Progress in Lipid Research**, v. 46, n. 3-4, p. 161–170, 2007.
- GRIEVE, A. G.; MOSS, S. E.; HAYES, M. J. Annexin A2 at the interface of actin and membrane dynamics: a focus on its roles in endocytosis and cell polarization. **International journal of cell biology**, v. 2012, p. 852430, 2012.
- GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Trypanosoma cruzi I diversity: towards the need of genetic subdivision? **Acta tropica**, v. 119, n. 1, p. 1–4, 2011.
- GULBINS, E.; KOLESNICK, R. Raft ceramide in molecular medicine. **Oncogene**, v. 22, n. 45, p. 7070–7077, 2003a.
- GULBINS, E.; KOLESNICK, R. Raft ceramide in molecular medicine. **Oncogene**, v. 22, n. 45, p. 7070–7, 2003b.
- HAN, R.; BANSAL, D.; MIYAKE, K.; et al. Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 7, p. 1805–13, 2007.
- HAN, R.; CAMPBELL, K. P. Dysferlin and muscle membrane repair. **Current opinion in cell biology**, v. 19, n. 4, p. 409–16, 2007.
- HAYES, M. J. Annexin 2 Binding to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate on Endocytic Vesicles Is Regulated by the Stress Response Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 14, p. 14157–14164, 2004.
- HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; PARRA-HENAO, G.; FERNANDES, M. C.; et al. Murine heart gene expression during acute Chagasic myocarditis. **Genomics Data**, v. 4, n. 5, p. 76–77, 2015. Elsevier B.V.
- HERNÁNDEZ-OSORIO, L. A.; MÁRQUEZ-DUEÑAS, C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.; et al. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of Trypanosoma cruzi: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 283842, 2010.
- HOLOPAINEN, J. M.; ANGELOVA, M. I.; KINNUNEN, P. K. Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. **Biophysical journal**, v. 78, n. 2, p. 830–8, 2000.
- HOUZELSTEIN, D.; GONÇALVES, I. R.; FADDEN, A. J.; et al. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 7, p. 1177–87, 2004.
- HUDSON, L.; SNARY, D.; MORGAN, S. J. Trypanosoma cruzi: continuous cultivation with murine cell lines. **Parasitology**, v. 88 (Pt 2), p. 283–94, 1984.
- JAISWAL, J. K.; ANDREWS, N. W.; SIMON, S. M. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. **The Journal of cell biology**, v. 159, n. 4, p. 625–35, 2002.
- KLESHCHENKO, Y. Y.; MOODY, T. N.; FURTAK, V. A.; et al. Human galectin-3

promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. **Infection and immunity**, v. 72, n. 11, p. 6717–21, 2004.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 16, n. 9, p. 381–7, 2000.

KOSICKA, A.; CUNLIFFE, A. D.; MACKENZIE, R.; et al. Attenuation of plasma annexin A1 in human obesity. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 27, n. 1, p. 368–78, 2013.

KOVAL, M.; PAGANO, R. E. Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1082, n. 2, p. 113–25, 1991.

LAW, A.-L.; LING, Q.; HAJJAR, K. A.; et al. Annexin A2 Regulates Phagocytosis of Photoreceptor Outer Segments in the Mouse Retina. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 17, p. 3896–3904, 2009.

LENNON, N. J.; KHO, A.; BACSKAI, B. J.; et al. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 50, p. 50466–73, 2003a.

LENNON, N. J.; KHO, A.; BACSKAI, B. J.; et al. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 50, p. 50466–73, 2003b.

LIFE TECHNOLOGIES. Life Technologies Real-time PCR handbook. , p. 1–20, 2012. Disponível em: <http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf>. .

MACHADO, F. C.; CRUZ, L.; SILVA, A. A. DA; et al. Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. **Glycobiology**, v. 24, n. 2, p. 179–84, 2014.

MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C.; et al. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, n. 24, p. 3003–8, 2000.

MAEDA, F. Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 361, 2012.

MANQUE, P. A.; PROBST, C. M.; PROBST, C.; et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. **Infection and immunity**, v. 79, n. 5, p. 1855–62, 2011.

MARTINELLI, P. M.; CAMARGOS, E. R. DA S.; AZEVEDO, A. A.; et al. Cardiac NGF and GDNF expression during *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 130, n. 1-2, p. 32–40, 2006.

MARTINS, R. M.; ALVES, R. M.; MACEDO, S.; YOSHIDA, N. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 7, p. 943–54, 2011.

MARTINS-MELO, F. R.; LIMA, M. DA S.; RAMOS, A. N.; ALENCAR, C. H.;

- HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 19, n. 8, p. 943–57, 2014.
- MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N.; ALENCAR, C. H.; LANGE, W.; HEUKELBACH, J. Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 17, n. 9, p. 1066–75, 2012.
- MATSUDA, C.; KIYOSUE, K.; NISHINO, I.; GOTO, Y.; HAYASHI, Y. K. Dysferlinopathy Fibroblasts Are Defective in Plasma Membrane Repair. **PLoS currents**, v. 7, 2015.
- MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 146, n. 4, p. 601–20, 2007.
- MCNEIL, P. L.; KIRCHHAUSEN, T. An emergency response team for membrane repair. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 6, p. 499–505, 2005.
- MENON, R. P.; HUGHES, R. C. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 264, n. 2, p. 569–76, 1999.
- MINEO, J. R. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Edufu, 2005.
- MOODY, T. N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. **FEBS Letters**, v. 470, n. 3, p. 305–308, 2000.
- MOREL, E.; GRUENBERG, J. Annexin A2 Binding to Endosomes and Functions in Endosomal Transport Are Regulated by Tyrosine 23 Phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 3, p. 1604–1611, 2008.
- MORTARA, R. A.; ANDREOLI, W. K.; TANIWAKI, N. N.; et al. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 1, p. 77–94, 2005.
- MOTT, A.; LENORMAND, G.; COSTALES, J.; FREDBERG, J. J.; BURLEIGH, B. A. Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. **Journal of cellular physiology**, v. 218, n. 2, p. 315–22, 2009.
- NOGUEIRA, P. M.; RIBEIRO, K.; SILVEIRA, A. C. O.; et al. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of Extracellular Vesicles**, 26. Nov. 2015.
- NOVAK, R.; DABELIC, S.; DUMIC, J. Galectin-1 and galectin-3 expression profiles in classically and alternatively activated human macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 9, p. 1383–1390, 2012.

- NUNES, M. C. P.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A. L. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767–76, 2013.
- PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 19, n. 1, p. 34, 2013. CEVAP.
- PONCINI, C. V.; ILARREGUI, J. M.; BATALLA, E. I.; et al. Trypanosoma cruzi Infection Imparts a Regulatory Program in Dendritic Cells and T Cells via Galectin-1-Dependent Mechanisms. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 195, n. 7, p. 3311–24, 2015.
- RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.
- RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010.
- REDDY, A.; CALER, E. V.; ANDREWS, N. W. Plasma Membrane Repair Is Mediated by Ca²⁺-Regulated Exocytosis of Lysosomes. **Cell**, v. 106, n. 2, p. 157–169, 2001. Elsevier.
- REIGNAULT, L. C.; BARRIAS, E. S.; SOARES MEDEIROS, L. C.; SOUZA, W. DE; CARVALHO, T. M. U. DE. Structures containing galectin-3 are recruited to the parasitophorous vacuole containing Trypanosoma cruzi in mouse peritoneal macrophages. **Parasitology research**, v. 113, n. 6, p. 2323–33, 2014.
- ROMANO, P. S.; ARBOIT, M. A.; VÁZQUEZ, C. L.; COLOMBO, M. I. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of Trypanosoma cruzi into the host cell. **Autophagy**, v. 5, n. 1, p. 6–18, 2009.
- ROOSTALU, U.; STRÄHLE, U. In vivo imaging of molecular interactions at damaged sarcolemma. **Developmental cell**, v. 22, n. 3, p. 515–29, 2012.
- SALOMONSSON, E.; CARLSSON, M. C.; OSLA, V.; et al. Mutational tuning of galectin-3 specificity and biological function. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 45, p. 35079–91, 2010.
- SALOMONSSON, E.; LARUMBE, A.; TEJLER, J.; et al. Monovalent interactions of galectin-1. **Biochemistry**, v. 49, n. 44, p. 9518–32, 2010.
- SANTOS, C. R. DOS; FESSEL, M. R.; VIEIRA, L. DE C.; et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Q4DV70 from Trypanosoma cruzi, a hypothetical protein with a putative thioredoxin domain. **Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications**, v. 65, n. Pt 6, p. 641–4, 2009.
- SARDIELLO, M.; PALMIERI, M.; RONZA, A. DI; et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5939, p. 473–7, 2009.
- SCHEFFER, L. L.; SREETAMA, S. C.; SHARMA, N.; et al. Mechanism of Ca²⁺-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. **Nature**

- communications**, v. 5, p. 5646, 2014. Nature Publishing Group.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008. Nature Publishing Group.
- SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 14–21, 2010.
- SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583–8, 2006.
- SETTEMBRE, C.; BALLABIO, A. TFEB regulates autophagy: an integrated coordination of cellular degradation and recycling processes. **Autophagy**, v. 7, n. 11, p. 1379–81, 2011.
- SETTEMBRE, C.; MALTA, C. DI; POLITO, V. A.; et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 332, n. 6036, p. 1429–33, 2011.
- SILVA, L.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia clin. biol.**, 1953.
- SOUZA, W. DE. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International review of cytology**, v. 86, p. 197–283, 1984.
- SOUZA, W. DE. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 17–36, 1999.
- SOUZA, W. DE; CARVALHO, T. M. U. DE; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International journal of cell biology**, v. 2010, 2010.
- SPAMPANATO, C.; FEENEY, E.; LI, L.; et al. Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. **EMBO molecular medicine**, v. 5, n. 5, p. 691–706, 2013.
- TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; et al. Chagas' disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 5, n. 4, p. 400–19, 1992.
- TEIXEIRA, A. R. L.; HECHT, M. M.; GUIMARO, M. C.; SOUSA, A. O.; NITZ, N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 3, p. 592–630, 2011.
- TEIXEIRA, T. L.; CRUZ, L.; MORTARA, R. A.; SILVA, C. V. DA. Revealing Annexin A2 and ARF-6 enrollment during *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigote-host cell interaction. **Parasites & vectors**, v. 8, p. 493, 2015.
- TOBE, T. Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: role of EspL2 in adherence and an alternative pathway for modulating cytoskeleton through Annexin A2 function. **FEBS Journal**, v. 277, n. 11, p. 2403–2408, 2010.
- TRAJKOVIC, K.; HSU, C.; CHIANTIA, S.; et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 5867, p. 1244–7, 2008.
- VRAY, B.; CAMBY, I.; VERCROYSE, V.; et al. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of

murine dendritic cells. **Glycobiology**, v. 14, n. 7, p. 647–57, 2004.

WHO. ., 2016. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 18/12/2015.

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

ZONCU, R.; BAR-PELED, L.; EFEYAN, A.; et al. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6056, p. 678–83, 2011.

ZÚÑIGA, E.; GRUPPI, A.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. I.; RABINOVICH, G. A. Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival. **Infection and immunity**, v. 69, n. 11, p. 6804–12, 2001.