

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

REBECCA TAVARES E SILVA BRÍGIDO

**“O USO DA PCR EM TEMPO REAL PARA O ESTUDO DA CARGA
PARASITÁRIA E DOS NÍVEIS TRANSCRICIONAIS DURANTE A INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi*”**

UBERLÂNDIA

2016

REBECCA TAVARES E SILVA BRÍGIDO

**“O USO DA PCR EM TEMPO REAL PARA O ESTUDO DA CARGA
PARASITÁRIA E DOS NÍVEIS TRANSCRICIONAIS DURANTE A INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi*”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Isabela Maria Bernardes Goulart

Coorientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

BANCA EXAMINADORA

Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart – Orientadora (UFU)

Dra. Diana Bahia (UFMG)

Dr. Álvaro Ferreira Júnior (UNIUBE)

Dra. Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas (UFU)

Dra. Bellisa de Freitas Barbosa (UFU)

UBERLÂNDIA

2016

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

B856u Brígido, Rebecca Tavares e Silva, 1979-
2016 “O uso da PCR em tempo real para o estudo da carga parasitária e dos níveis transcricionais durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*” / Rebecca Tavares e Silva Brígido. - 2016.
73 p. : il.

Orientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart.

Coorientador: Claudio Vieira da, Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3. Chagas, Doença de - Teses. 4. Citoesqueleto - Teses. I. Goulart, Isabela Maria Bernardes. II. Silva, Claudio Vieira da. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

À minha filha Isabella (nascida durante o
Doutorado), minhas enteadas Maria Julia e Vitória Sophia, e a minha esposa pela
paciência e tempo que deixamos de estar juntas,
À minha irmã Samantha, pelo apoio incondicional e ensinamentos
dos valores da vida,
Aos meus pais Jonas e Deuza pela educação e amor,
Aos meus irmãos Steven e Nicholas,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva pelo convívio, confiança e constante incentivo ao crescimento intelectual.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Isabela Maria Bernardes Goulart pela oportunidade de crescimento e experiência profissional.

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado para o desenvolvimento deste estudo.

À Paula Brígido pela constante ajuda e apoio.

Aos queridos Marlus, Thaise pelo apoio na interpretação dos dados e na escrita.

À Júlia Gouveia pelo auxílio na bancada em momentos bem difíceis.

A todos do LATRI e LABCREDESH, pela agradável convivência e aprendizagem diária.

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, aos seus alunos e funcionários.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia.

Agradeço às secretárias, Gisele e Viviane, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia pela paciência e constante ajuda.

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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: FORMAS EVOLUTIVAS DO <i>Trypanosoma cruzi</i> . (A) AMASTIGOSTAS, (B) EPIMASTIGOTAS E (C) TRIPOMASTIGOTAS. FIGURA: PAULA BRÍGIDO.	14
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DE VIDA DO PROTOZOÁRIO FLAGELADO <i>Trypanosoma cruzi</i> . FONTE: PAULA BRÍGIDO	15
FIGURA 3: ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE INVASÃO POR <i>T.cruzi</i> EM MIOBLASTO E A AÇÃO DE CADA PROTEÍNA. (A) PROCESSO DE INVASÃO CELULAR POR <i>Trypanosoma cruzi</i> PROMOVEDO LESÃO CELULAR E INFLUXO DE CÁLCIO; (B) TFEB SENDO UM REGULADOR DA EXOCITOSE DE LISSOSSOMOS (C) ASM ENZIMA LISSOSSOMAL UTILIZADA PARA PROMOVER A SÍNTESE DE CERAMIDA, SENDO IMPORTANTE PARA O PROCESSO DE REPARO DE MEMBRANA DURANTE A INTERNALIZAÇÃO DO PARASITA. (D) APÓS A LESÃO A DISFERLINA TAMBÉM AJUDA NO PROCESSO REPARO DE MEMBRANA AUXILIANDO ASSIM NA SOBREVIVÊNCIA DA CÉLULA.....	19
FIGURA 4: AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR DE <i>T. cruzi</i> . (A) D71 / D72; (B) P21FW / P21RV; (C) S35 / S36; E (D) TCZ1 / TCZ2. 1, 2, 10, 11, 19, 20, 28 E 29: TECIDO DE CORAÇÃO DE CAMUNDONGO INFECTADO COM <i>T. CRUZI</i> ; 3, 4, 12, 13, 21, 22, 30 E 31: TECIDO DE CORAÇÃO DE CAMUNDONGO NÃO INFECTADO; 5, 6, 14, 15, 23, 24, 32 E 33: C2C12 INFECTADOS POR <i>T. CRUZI</i> ; 7, 8, 16, 17, 25, 26, 34 E 35: SOMENTE C2C12; 9, 18, 27 E 36: CONTROLE NEGATIVO; MM: PADRÃO DE PESO MOLECULAR DE 50PB.	37
FIGURA 5: (A) PRODUTO DE PCR CONVENCIONAL DE <i>Trypanosoma cruzi</i> USANDO INICIADORES P21FW / P21RV; (B) CURVA PADRÃO PARA A PCR QUANTITATIVA GERADA 6 DILUIÇÕES EM SÉRIE; (C) CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL; (D) CURVA DE DISSOCIAÇÃO.....	38
FIGURA 6: CURVA DE DISSOCIAÇÃO GERADA PELA RT-QPCR. PICOS OBTIDOS NA CURVA DE DISSOCIAÇÃO OU “CURVA DE MELTING” 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.	41
FIGURA 7: PARÂMETROS DE PESO CORPORAL E DO CORAÇÃO DE ANIMAIS INFECTADOS PELO <i>T. cruzi</i> . (A) PESO DOS ANIMAIS DURANTE O ESTUDO E EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA. (B) PESO DO CORAÇÃO DOS ANIMAIS. (C) TAMANHO DOS CORAÇÕES DE CAMUNDONGOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA. *P<0,05; *** P<0,001.	42
FIGURA 8: PARASITEMIA DURANTE A FASE AGUDA E APÓS IMUNOSSUPRESSÃO NA FASE CRÔNICA.	43
FIGURA 9: QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA NO TECIDO ANIMAL INFECTADO DURANTE AS DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO E APÓS A IMUNOSSUPRESSÃO. **** P<0,0001.....	44
FIGURA 10: NÍVEIS TRANSCRICIONAIS EM TECIDO CARDÍACO DE CAMUNDONGOS NA FASE AGUDA. NÍVEL DE EXPRESSÃO RELATIVA (A) TFEB, (B) ASM (C) DISFERLINA (D) GALECTINA 1 (E) GALECTINA 3 (F) ANEXINA A2, QUANDO COMPARADO COM A EXPRESSÃO DE GENES EM ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE. *** P<0,001; **** P<0,0001.....	45
FIGURA 11: NÍVEIS TRANSCRICIONAIS EM TECIDO CARDÍACO DE ANIMAIS EM FASE CRÔNICA IMUNOSSUPRIMIDOS. (A) TFEB, (B) ASM, (C) DISFERLINA (D) GALECTINA 1 (E) GALECTINA 3 (F) ANEXINA A2 NOS DIFERENTES GRUPOS DE FASE CRÔNICA. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: INICIADORES UTILIZADOS PARA A ANÁLISE DOS NÍVEIS TRANSCRICIONAIS RELATIVOS POR PCR EM TEMPO REAL.	32
TABELA 2: INICIADORES SELECIONADOS NO PUBMED.	33
TABELA 3: PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO E REAÇÃO CRUZADA DOS INICIADORES.	35
TABELA 4: INICIADORES SELECIONADOS PARA <i>Trypanosoma cruzi</i> (XM_812182.1).	36
TABELA 5: ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO PCR QUANTITATIVO PARA DETECTAR <i>T. cruzi</i>	39
TABELA 6: VALIDAÇÃO DOS INICIADORES PARA A RT-qPCR.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus celcius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrometro
A2	Anexina 2
AE	Amastigotas Extracelular
ASM	Enzima esfingomiolina esferase ácida
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C2C12	Mioblastos de murino
C57BL/6	Linhagem isogênica de camundongos de laboratório
Ca ²⁺	Íon de Cálcio
cDNA	DNA complementar
cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Gás Dióxido de Carbono
CT	Ciclo limiar de quantificação (<i>Cycle Threshold</i>)
DC	Doença de Chagas
DMEM	<i>Meio Eagle Modificado por Dulbecco</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsDNA	DNA de dupla fita
dUTP	Desoxinucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F-actina	Filamentos de actina
FRET	Transferência de energia por ressonância de fluorescência
Fw	Iniciador sense (<i>Forward</i>)
G	G-force
g	grama
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
h	hora
HEPES	<i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>
kDNA	Ácido desoxirribonucleico de cinetoplasto
mg/mL	Miligrama por mililitro
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minutos
mL	Mililitros
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos (<i>Mammalian target of rapamycin</i>)
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
R ²	Coeficiente de regressão linear
RNA	Ácido ribonucléico
RNAr	RNA ribossomal

RT-qPCR	Reação de transcrição reversa, seguida de PCR quantitativo em tempo real
Rw	Iniciador anti sense (<i>Reverse</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SYBRGreen	Corante fluorescente intercalante de DNA de dupla fita
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TBE	Tampão de corrida de eletroforese
TFEB	Fator de transcrição EB
Tm	Temperatura de fusão (<i>Melting</i>)
VERO	Fibroblastos de rim de macaco verde da África
$2^{-\Delta\Delta CT}$	Método Delta Delta CT

Sumário

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1	DOENÇA DE CHAGAS E O <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.2	FATOR DE TRANSCRIÇÃO EB, ESFINGOMIELINA ESFERASE ÁCIDA E DISFERLINA - PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA SINALIZAÇÃO, INVASÃO CELULAR E REPARO DE MEMBRANA.....	16
1.3	GALECTINAS E ANEXINAS - PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO E ADESÃO CELULAR	19
1.4	TECNOLOGIA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL	20
2	OBJETIVO GERAL	24
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	LOCAL DO ESTUDO	25
3.2	PARASITAS	25
3.3	CULTURA DE CÉLULAS	25
3.4	INFECÇÃO DOS MIOBLASTOS.....	26
3.5	INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS	27
3.6	IMUNOSSUPRESSÃO DOS CAMUNDONGOS	27
3.7	EXTRAÇÃO DE DNA	27
3.8	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (CDNA)	28
3.9	PESQUISA E SELEÇÃO DE INICIADORES UTILIZADOS EM PESQUISAS ANTERIORES PARA A QUANTIFICAÇÃO DE <i>T. cruzi</i>	28
3.10	DESENHO E VALIDAÇÃO DOS INICIADORES.....	28
3.11	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR CONVENCIONAL).....	29
3.12	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA POR PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVO (QPCR)	29
3.13	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS TRANSCRICIONAIS RELATIVOS POR PCR EM TEMPO REAL (RT-QPCR).....	30
3.14	NORMAS DE BIOSSEGURANÇA	32
3.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4	RESULTADOS	33
4.1	NOVA FORMA DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE <i>T. cruzi</i>	33
4.1.1	Pesquisa e seleção de iniciadores utilizados para a quantificação do <i>T. cruzi</i> descrito em pesquisas anteriores	33

4.1.2	Iniciadores com base em fragmento do gene P21 (xm_812182.1) foram específicos para o dna de <i>T. cruzi</i>	35
4.1.3	Comparação entre os perfis moleculares de cada par de iniciadores por reação em cadeia da polimerase (PCR convencional).....	36
4.1.4	Especificidade e sensibilidade do pcr quantitavo em tempo real (qPCR) para a detecção de <i>T. cruzi</i>	37
4.2	ANÁLISE DOS NÍVEIS TRANSCRICIONAIS DE GENES RELACIONADOS À ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO E REPARO DE MEMBRANA PLASMÁTICA	40
4.2.1	Especificidade dos iniciadores utilizados no RT-qPCR mediante a curva de dissociação.....	40
4.2.2	A infecção por <i>T. cruzi</i> durante as fases aguda, crônica e imunossupressão da fase crônica, promoveu mudanças em relação ao peso corporal e do coração em camundongos.....	41
4.2.3	As diferenças entre a parasitemia na fase aguda e após imunossupressão na fase crônica da infecção experimental.	42
4.2.4	A imunossupressão na fase crônica promove um incremento na carga parasitária no tecido cardíaco.	43
4.2.5	Fase aguda da infecção promove um aumento significativo na expressão gênica de proteínas envolvidas na organização do citoesqueleto.....	44
4.2.6	Na fase crônica da infecção e após a imunossupressão ocorre alteração dos níveis transcripcionais no tecido cardíaco.	45
5	DISCUSSÃO	46
5.1	NOVA FORMA DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE <i>T. cruzi</i>	47
5.2	ANÁLISE DOS NÍVEIS TRANSCRICIONAIS DE GENES RELACIONADOS À ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO E REPARO DE MEMBRANA PLASMÁTICA	49
5.2.1	Retorno de parasitemia e maior carga parasitária no tecido cardíaco em fase crônica após imunossupressão	49
5.2.2	Aumento na expressão gênica de Galectina 3 e Anexina A2 na fase aguda, crônica e após imunossuprimidos de infecção.	50
5.2.3	Expressão de genes na fase crônica da infecção e após a imunossupressão	51
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

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 por *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 desenvolveu uma nova forma de detecção e quantificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) da carga parasitária de *T. cruzi* e a quantificou os níveis transcricionais relativos (RT-qPCR) da Disferlina, Esfingomielinase ácida (ASM), Fator de Transcrição EB (TFEB), Galectinas 1 e 3 e Anexina A2. Neste estudo, foi demonstrado que a quantificação por PCR em tempo real utilizando os iniciadores P21fw e P21rv foi específico e sensível para a detecção de *T. cruzi in vivo* e *in vitro*, bem como os níveis transcricionais de genes relacionados a organização do citoesqueleto e reparo de membrana plasmática são moduladas em resposta ao dano gerado pelo parasita.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Organização do citoesqueleto. Reparo da membrana. qPCR. RT-qPCR.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is causative agent of Chagas disease, one of most neglected tropical diseases. Estimated that about 11 million people worldwide are infected by *T. cruzi* and about 6 to 7 million people are at risk in endemic areas. During the process of invasion of host and parasite interact enabling signal transduction and gene expression modulation in response to invasion. The diversity of activated proteins and pathways to repair the damage by disruption of the plasma membrane interest to us and thus present study developed a new form of detection and quantitation by polymerase chain reaction in real time (qPCR) of parasitic load *T. cruzi* and quantified transcriptional levels relative (RT-qPCR) of dysferlin, Sphingomyelin acid esterase (ASM), transcription factor EB (TFEB) Galectins 1 and 3 and Annexin A2. This study demonstrated that quantification by real time PCR using primers P21fw and P21rv was specific and sensitive for detection of *T. cruzi in vivo* and *in vitro*, as well as transcriptional levels of genes related to cytoskeletal organization and repair plasma membrane are modulated in response to damage generated by parasite.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Cytoskeletal organization. Membrane repair. qPCR. RT-qPCR.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 DOENÇA DE CHAGAS E O *Trypanosoma cruzi*

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

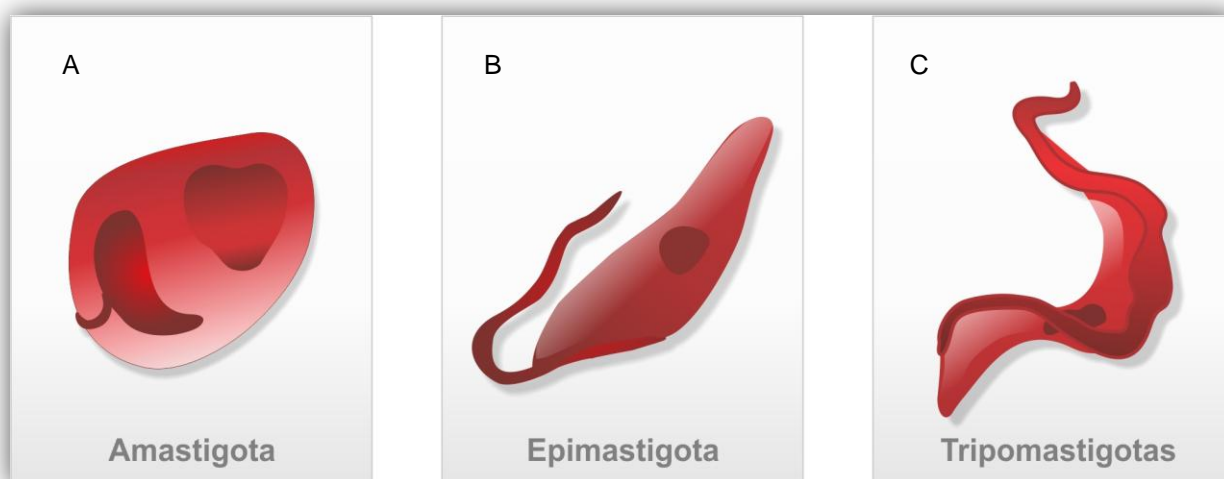
Estima-se que no mundo existam aproximadamente de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas pelo protozoário, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica, constituindo assim problema preocupante de saúde pública (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA et al., 2006; COURA; VIÑAS, 2010; MARTINS-MELO 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; BERN; PINAZO 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).

O protozoário *T. cruzi* pertence ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e 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 amastigota é uma forma replicativa e infectiva no hospedeiro vertebrado (Figura 1 A), possuindo aproximadamente 2 a 5 μm de diâmetro, com formato arredondado e flagelo bem curto. 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. 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 celular (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.

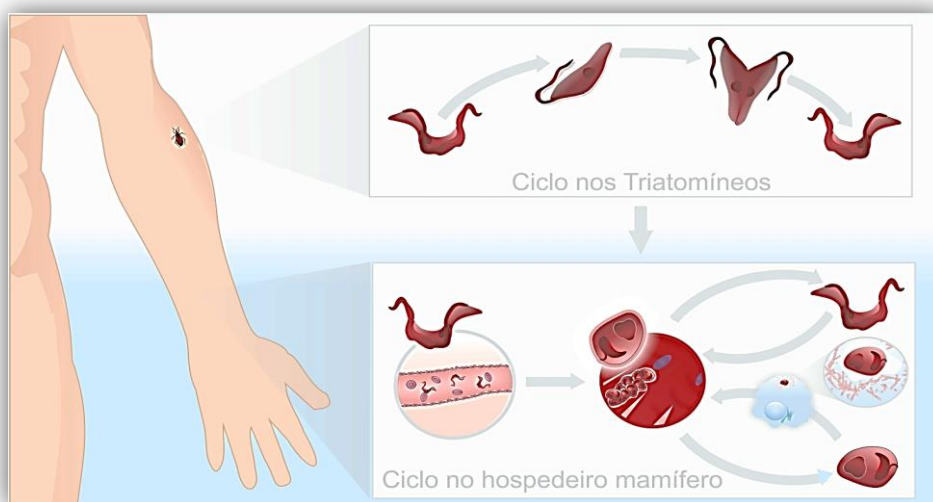


Fonte: Paula Brigido.

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, durante o repasto sanguíneo, ingere sangue do hospedeiro mamífero contendo formas tripomastigotas sanguíneas, que se modificam em formas epimastigotas no sistema digestório do inseto, onde se multiplicam intensamente, migram para a porção posterior do trato digestório do inseto, onde devido à escassez de nutrientes se transformam em formas tripomastigotas metacíclicas. Quando o inseto pica um novo hospedeiro mamífero transmite essas formas infectantes pelas fezes e urina depositadas no local da picada. Posteriormente, estas formas evolutivas penetram pela pele lesionada 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 ingeridas novamente pelo inseto vetor (ANDREWS et al., 1990; KOLLIEN; SCHAUB, 2000; HERNÁNDEZ-OSORIO et al., 2010; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS et al., 2010). Uma alternativa de subciclo pode ocorrer envolvendo formas amastigotas procedentes da lise prematura das células infectadas, chamadas amastigotas intracelulares (HUDSON; SNARY; MORGAN 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*.



Fonte: 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 conseqüentemente 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 (cardiomiopatia chagásica), e 10% alterações digestivas (mega cólon e mega esôfago) e neurológicas. Posteriormente, a infecção pode levar à morte súbita ou insuficiência cardíaca causada pela destruição progressiva do tecido cardíaco (TANOWITZ et al., 1992; CAMPOS DE CARVALHO et al., 2009; “WHO,” 2016).

1.2 FATOR DE TRANSCRIÇÃO EB, ESFINGOMIELINA ESFERASE ÁCIDA E DISFERLINA - PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA SINALIZAÇÃO, INVASÃO CELULAR E REPARO DE MEMBRANA.

T. cruzi está entre os mais bem sucedidos parasitas 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 e o parasito durante a invasão e o estabelecimento da infecção ativa processos de sinalização celular que culminam em alterações morfológicas, metabólicas e na modulação da expressão de diversos genes da célula hospedeira ((MACHADO et al., 2000; MARTINELLI et al., 2006; MARTINS et al., 2011; MAEDA; CORTEZ; YOSHIDA 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 parasita-hospedeiro ainda não estão completamente esclarecidos (YOSHIDA, 2006; GUHL; RAMÍREZ, 2011).

Sabe-se que *T. cruzi* durante a invasão promove mobilização de Ca^{+2} intracelular (Figura 3 A), tanto no parasita quanto na célula alvo (REDDY; CALER; ANDREWS et al., 2001; JAISWAL; ANDREWS; SIMON 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; CORTEZ; YOSHIDA 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. Deve-se levar em consideração que os lisossomos não são apenas organelas de degradação, 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; CALER; ANDREWS et al., 2001; JAISWAL; ANDREWS; SIMON 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).

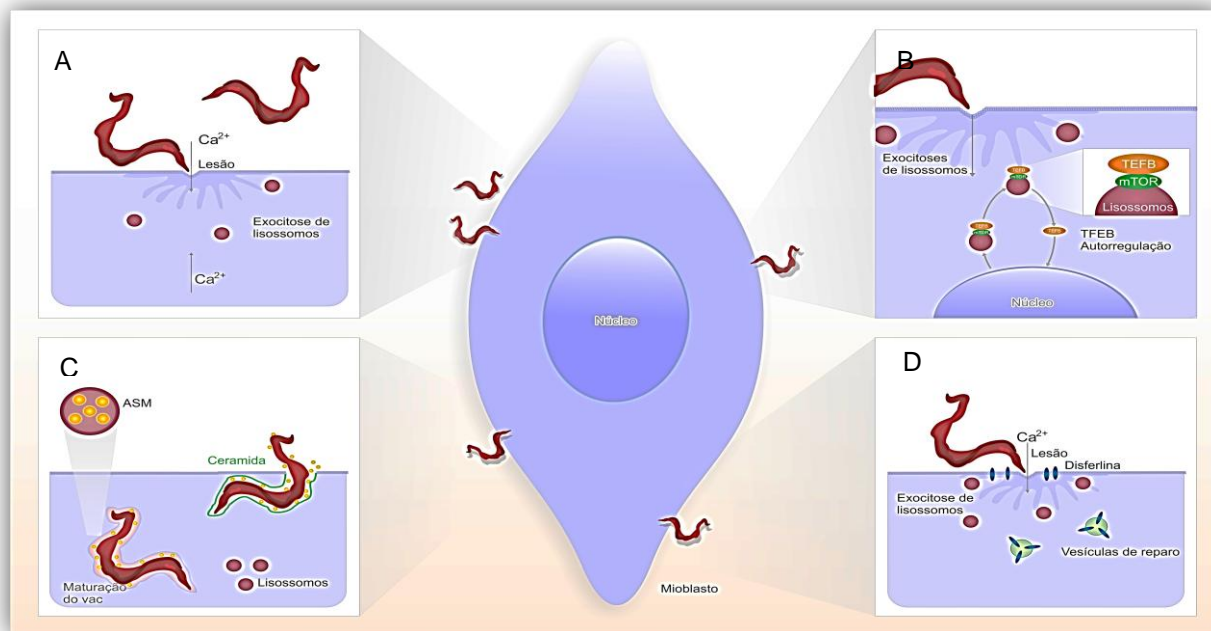
A resposta dos lisossomos para os sinais fisiológicos são regulados pelo fator de transcrição EB (TFEB). TFEB é um importante gene regulador da biogênese lisossômica e da autofagia, conduz à geração de novos lisossomos, induz a ancoragem, a fusão de lisossomos com a membrana plasmática e o aumento do número de autofagossomos em uma variedade de tipos de células (SARDIELLO et al., 2009a; SETTEMBRE et al., 2011; SETTEMBRE; BALLABIO, 2011). 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; REAL; YOSHIDA et al., 2015). A atividade de TFEB é 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., 2009a; SETTEMBRE; BALLABIO, 2011; SPAMPANATO et al., 2013).

Durante a invasão celular pelo parasita, a célula promove a exocitose dos lisossomos liberando a enzima lisossomal esfingomielinase ácida (ASM) (KOVAL; PAGANO, 1991; FERNANDES et al., 2011). A ASM cliva a foscorilcolina 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; ANGELOVA; KINNUNEN et al., 2000; GULBINS; KOLESNICK, 2003a; BLITTERSWIJK, VAN et al., 2003; GRASSMÉ; RIETHMÜLLER; GULBINS 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 dessas células do 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 processo de reparo, sua ausência ou expressão reduzida está envolvida em doenças neuromusculares como a Miopatia de Miyoshi (MATSUDA et al., 2015). 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., 2003; MCNEIL; KIRCHHAUSEN, 2005; GLOVER; BROWN, 2007).

FIGURA 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) TFEB 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 parasita. (D) após a lesão a Disferlina também ajuda no processo reparo de membrana auxiliando assim na sobrevivência da célula.



Fonte: Paula Brígido.

1.3 GALECTINAS E ANEXINAS - PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO E ADESÃO CELULAR

As Galectinas pertencem à família das lectinas, sendo proteínas que se ligam a carboidratos e podem reconhecer glicoproteínas, glicolipídeos e moléculas como lipídeos e proteínas, sendo encontradas na matriz extracelular, na superfície celular, no citoplasma e no núcleo (MENON; HUGHES, 1999; HOUZELSTEIN et al., 2004; FUNASAKA; RAZ; NANGIA-MAKKER et al., 2014). A Galectina 1 e a Galectina 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; DABELIC; FLÖGEL et al., 2006; SALOMONSSON; CARLSSON; et al., 2010; SALOMONSSON; LARUMBE; et al., 2010; NOVAK; DABELIC; DUMIC et al., 2012). A Galectina 1 está relacionada a eventos imunoregatórios frente à infecção por *T. cruzi*, sendo capaz de induzir a proliferação do parasita (ZÚÑIGA et al., 2001; CORREA et al., 2003). Por outro lado, proteínas de superfície de *T. cruzi*

interagem com a Galectina 3, durante a infecção ocorrendo um aumento da expressão dessa lectina e de seus ligantes. A expressão de Galectina 3 é importante para a adesão de tripomastigotas às células, por meio da ligação da Galectina 3 à superfície do parasita e também à superfície de células musculares aumentando a adesão (MOODY; OCHIENG; VILLALTA, TAPRIA N. 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; CREUTZ; MOSS et al., 2005; TOBE, 2010; BANDOROWICZ-PIKULA; WOS; PIKULA et al., 2012). A anexina A2 está relacionada com as vias endocíticas, a reorganização da actina em eventos de internalização de patógeno e o tráfego de vesículas dependentes da polimerização de actina, eventos importantes para a internalização do parasita (HAYES, 2004; MOREL; GRUENBERG, 2008; LAW et al., 2009; GRIEVE; MOSS; HAYES et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2015).

1.4 TECNOLOGIA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL

Na tentativa de superar as limitações apresentadas pelas técnicas clássicas, há cerca de dez anos, os métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para detecção e quantificação de genes e espécies (MICHALSKY et al., 2002), com destaque para a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*). A alta sensibilidade e especificidade, a habilidade de detectar e identificar o alvo, e o fato de poder ser aplicada diretamente em amostras clínicas, produzindo um resultado confiável dentro de poucas horas, são vantagens indiscutíveis da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais (ABDA, BEN et al., 2011; PAIVA CAVALCANTI, DE et al., 2013). A PCR em tempo real é um método extremamente sensível e reprodutível de quantificação da carga parasitária e da expressão gênica. É altamente específica, pois se baseia na detecção de fluorescência emitida por sondas fluorogênicas ou corantes intercalantes, como o *SyBRGreen*. A medida que o produto amplificado aumenta, o sinal de fluorescência também aumenta proporcionalmente. Os corantes intercalantes como este emitem fluorescência apenas quando associados ao DNA de fita dupla (dsDNA) (BUSTIN, 2000; VELDEN, VAN DER et al., 2003; PETERS et al., 2004).

A quantificação do produto amplificado ocorre durante a fase exponencial da reação, e o limiar desta fase é determinado pelo ciclo no qual é detectada emissão de fluorescência significativa, denominado de ciclo limiar de amplificação (*cycle threshold* - CT) (LIFE TECHNOLOGIES, 2012). A fluorescência é detectada pelo aparelho quando o *SYBRGreen* está associado ao dsDNA. A fluorescência emitida pelas moléculas de *SYBRGreen* em suspensão no meio, quando ocorre a desnaturação, é pequena e subtraída pelo *software* durante a reação (BUSTIN, 2000). Durante a polimerização catalisada pela enzima DNA polimerase as moléculas de *SYBRGreen* se ligam ao produto recém sintetizado, e um aumento da fluorescência é observado em tempo real, o que possibilita o monitoramento contínuo da reação (LIFE TECHNOLOGIES, 2012). No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do fluoróforo são liberadas e uma queda no sinal da fluorescência é observada. Apesar de o *SYBRGreen* não ser específico, podendo se ligar à dímeros de primers ou outros produtos inespecíficos, é possível monitorar essas situações pela análise da curva de dissociação observando a temperatura de fusão (*Temperature melting* – Tm) (LIFE TECHNOLOGIES, 2012). No sistema em que se utiliza de sondas, o método de detecção mais comum é a utilização de sondas marcadas com um corante *reporter* na extremidade 5' e um *quencher* na 3'. Quando a sonda está intacta o *quencher* capta a energia emitida pelo *reporter*, devido a proximidade dos dois corantes, através da transferência de energia por ressonância de fluorescência através do espaço (FRET). Quando a sonda é clivada pela atividade exonuclease 5' da DNA polimerase os fluoróforos são separados aumentando o sinal da fluorescência que é detectado pelo aparelho (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

A quantificação dos produtos da PCR é realizada, principalmente, por dois métodos, a quantificação absoluta e relativa. Pelo método da quantificação absoluta (qPCR) utiliza-se uma curva padrão, previamente padronizada, que deve estar presente em todas as placas de ensaio. Interpolando as quantidades da amostra alvo com base na curva padrão, o *software* fornece a quantidade exata de moléculas alvo contidas na amostra (LIFE TECHNOLOGIES, 2012). Esta técnica vem sendo utilizada por diversos autores, em amostras provenientes de animais e pacientes humanos, possibilitando a realização de estudos relacionados à carga parasitária, interação hospedeiro-parasito e monitoramento da terapia (ABDA, BEN et al., 2011; PAIVA CAVALCANTI, DE et al., 2013). Os resultados da qPCR são baseados em

gráficos gerados no computador durante a reação (CAVALCANTI, 2008). A análise dos resultados é feita através de quatro parâmetros:

a) Curva de amplificação - nos informa o Ciclo limiar de quantificação (CT) das amostras em análise, inclusive a curva padrão;

b) Espectro - mostra a captação da fluorescência por filtros previamente determinados, a depender do corante fluorescente utilizado no ensaio;

c) Componente - mostra o comportamento da emissão de fluorescência por cada corante ou fluorocromo usado durante a reação. Sendo a referência passiva do aparelho o parâmetro que deve manter-se constante;

d) Curva de dissociação - onde é possível observar a emissão de fluorescência pela temperatura de fusão ou temperatura de *melting* (T_m). A T_m é a temperatura onde 50% dos produtos amplificados encontram-se dissociados, na forma de fita simples, causando uma queda brusca da intensidade de fluorescência pela liberação do corante *SYBRGreen* (BROWN, 2003). Nesta análise podem ser verificadas amplificações inespecíficas e dímeros de primer, uma vez que cada alvo deve ter sua T_m específica. Através desta propriedade da qPCR em alterar a T_m para diferentes produtos amplificados, têm-se utilizado a metodologia para diferenciação de espécies (WEIRATHER et al., 2011; PITA-PEREIRA et al., 2012; PAIVA CAVALCANTI, DE et al., 2013; TOZ et al., 2013).

A quantificação relativa é subdividida em dois métodos, o método da curva padrão e o método do CT comparativo. Com base no método CT comparativo deve-se, primeiramente, avaliar se as eficiências das amplificações do alvo e do controle endógeno são equivalentes. A eficiência da reação é calculada pela construção de uma curva padrão que é graficamente representada como um gráfico de regressão linear semi-log do valor do CT em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucléico. Um slope da curva padrão próximo de -3,32 indica uma reação com 100% de eficiência e produzirá um aumento de 10 vezes no amplificado a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ($\log_2^{10} = 3,3219$) (LIFE TECHNOLOGIES, 2012). Valores que diferem muito desses podem indicar má qualidade da amostra ou erro de pipetagem. Para cada curva padrão o *software* procura o melhor ajuste entre os pontos, calcula a regressão linear e fornece o R^2 que mede quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de CT das amostras padrão (ideal $R^2 = 0,99$), o *slope* e o *y-intercept* que indicam o valor esperado de CT para uma amostra com quantidade 1 (LIFE TECHNOLOGIES,

2012). Para esse método é também necessário utilizar uma amostra padrão em todas as placas de ensaio, o calibrador, que deve ser uma amostra concentração conhecida. Durante a reação de qPCR, o alvo é normalizado com um gene *housekeeping* (controle endógeno) e comparado diretamente com o calibrador, contabilizando uma quantidade maior ou menor de RNAm (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

Previamente à quantificação relativa é necessário realizar a RT-PCR (*Reverse Transcriptase* PCR), que consiste em uma técnica na qual são produzidas cópias de cDNA (DNA complementar) a partir da fita simples de RNAm, amplamente utilizada nos estudos de expressão gênica. A fita de DNA complementar é formada basicamente pela ação de uma enzima (RT) Transcriptase Reversa e iniciadores randômicos que maximiza o número de moléculas de RNAm que podem ser analisadas a partir de uma pequena amostra de RNA (BUSTIN, 2000). O cDNA é utilizado como amostra biológica para amplificação de um determinado fragmento de um gene alvo na reação de PCR.

São várias as vantagens da PCR em tempo real em relação à convencional, dentre elas destacam-se, a maior sensibilidade, pois a PCR em tempo real utiliza a fluorescência para detecção do amplicon, maior reprodutibilidade, pois fornece a quantificação em números, enquanto a convencional utiliza gel de agarose e corantes intercalantes como o brometo de etídio altamente tumorigênicos e cálculo da densidade óptica para quantificação, o que diminui sua sensibilidade e reprodutibilidade (LIFE TECHNOLOGIES, 2012). Para ambos os sistemas o desenho do experimento e a padronização da reação são essenciais para a obtenção de bons resultados (BUSTIN, 2000; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001)

2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nova forma de detecção e quantificação da carga parasitária de *T. cruzi*, e analisar os níveis transcricionais de genes relacionados à organização do citoesqueleto e reparo de membrana plasmática durante a infecção experimental em camundongos utilizando a PCR em tempo real.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar um novo par de iniciadores específicos e sensíveis para a detecção e quantificação de *T. cruzi*;
- Comparar *in silico* os iniciadores já existentes com o desenvolvido nesta Tese quanto à especificidade e sensibilidade para o PCR em tempo real;
- Quantificar a expressão dos genes Disferlina, Galectinas 1 e 3, Anexina A2, TFEB e ASM em corações de camundongos infectados por *T. cruzi* nas fases aguda e crônica da infecção;
- Quantificar a expressão dos genes Disferlina, Galectinas 1 e 3, Anexina A2, TFEB e ASM em corações de camundongos imunossuprimidos e infectados por *T. cruzi* na fase crônica da infecção;
- Associar a expressão dos genes com a carga parasitária durante as fases da infecção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ESTUDO

Este estudo foi realizado na Universidade Federal de Uberlândia e os procedimentos experimentais foram conduzidos no Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI – ICBIM/UFU) e no Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária / Hanseníase (CREDESH - HC/UFU).

3.2 PARASITAS

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).

3.3 CULTURA DE CÉLULAS

As células da linhagem *Vero* (fibroblastos de rim de macaco verde da África) foram utilizadas 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 das células 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 10 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.

Mioblastos (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 10 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 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 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*.

3.4 INFECÇÃO DOS MIOBLASTOS

Células C2C12 foram retiradas da garrafa de cultura por meio da tripsinização, plaqueadas em placas de polietileno de 6 poços a uma concentração de 10⁶ células/poço e incubadas *overnight* na estufa de CO₂, em DMEM suplementado com 10% de SFB, a 37°C com 5% de CO₂ para completa aderência. No dia seguinte, foi feita a lavagem dos poços (3x) com PBS e posteriormente o meio foi repostado. Depois das lavagens, as células foram desafiadas com 50 tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y por célula por 2 horas. Após o tempo de incubação, os poços foram cuidadosamente lavados 3 vezes com PBS para a retirada de parasitas que não internalizaram. Foi utilizado como controle células não infectadas. 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.

3.5 INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Camundongos machos C57BL/6 com 20 semanas, pesando cerca de 23 g, permaneceram no Biotério da UFU em ambiente controlado de 12 horas de luz e 12 horas no escuro, em temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 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 foram infectados com 100 μL de solução salina contendo 2×10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, pela via intraperitoneal. Após 1 mês (Fase aguda), 3 meses imunossuprimidos ou não (fase crônica) os animais foram sacrificados e os corações recolhidos e processados para a quantificação da carga parasitária e dos níveis transcricionais (7 animais por grupo). Para cada grupo infectado, foi utilizado um grupo não infectado da mesma idade como controle. Durante todo o procedimento, corações e os animais foram pesados para avaliar a variação de peso corporal dos diferentes grupos.

3.6 IMUNOSSUPRESSÃO DOS CAMUNDONGOS

Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados (Após 3 meses de infecção) com *T. cruzi*, foram imunossuprimidos com fosfato de dexametasona administrada *ad libitum* na água de beber a um nível de dosagem de 12 mg / mL, durante 10 dias (KIM; HEALEY, 2001). A parasitemia foi seguida desde o dia 1 de infecção até dia 10 pela coleta de sangue, formas sangüíneas de *T. cruzi* foram avaliadas sob condições padronizadas por observação microscópica direta de 5 μL de sangue.

3.7 EXTRAÇÃO DE DNA

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.

3.8 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

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), e amostras com pureza ideal (~2,0) foram selecionadas.

Para síntese de DNA complementar 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 reação 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.

3.9 PESQUISA E SELEÇÃO DE INICIADORES UTILIZADOS EM PESQUISAS ANTERIORES PARA A QUANTIFICAÇÃO DE *T. cruzi*

A pesquisa foi realizada no PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) de estudos utilizando qPCR para quantificar *T. cruzi*, e iniciadores foram utilizados para comparação com o nosso par de primers desenhados neste trabalho.

3.10 DESENHO E VALIDAÇÃO DOS INICIADORES

Os iniciadores específicos 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.

3.11 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR CONVENCIONAL)

A reação de PCR consistiu em 10 mM Tris-HCl pH 8, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmoles de cada iniciador; P21fw (5'-AACGCCACC ATCAATCTTTTG -3'), P21rv (5'-CGTCGCATTCCTCATTTCTTC-3'), que resulta na amplificação de fragmento de 65 pares de base *T. cruzi*, 1,25 U de Taq Platinum (Invitrogen), 50 ng de DNA e água ultrapura para produzir um volume total de reação de 25 µL. As amplificações foram realizadas no GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), de acordo com as seguintes condições: 95°C durante 5 min, 35 ciclos de 94°C durante 30 seg; 58°C durante 30 seg e 72°C durante 1 min e uma extensão final de 72°C durante 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando um tampão 1 x TBE (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA) a 100V durante 100 minutos e corados com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Os produtos de PCR em gel foram visualizados em Universal capa II (Bio-Rad) de foto-documentador. Foi utilizado um marcador molecular de 50 pares de bases para o gel de agarose (Promega, EUA).

3.12 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA POR PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVO (qPCR)

Para as reações de qPCR, com um volume final de 12,5 µL, foram adicionados 2 µL (~ 50 ng) de DNA extraído e 0,4 µM de cada iniciador. 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. 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 *melting* e produtos não específicos.

Para a quantificação do parasita primeiramente foi criada uma curva padrão com diluições em série a partir de DNA extraído de 10^8 parasitas/mL de *T. cruzi* juntamente com 50 mg de tecido de coração de camundongo não infectado (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. 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).

3.13 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS TRANSCRICIONAIS RELATIVOS POR PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

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 *melting* 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 *melting* foi realizada em cada ensaio, a fim de detectar a ampliações inespecíficas.

Os níveis relativos de expressão gênica foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ animais infeCTados (alvo do gene CT - endógena do gene CT) - ΔCt animais não infectados (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 dos níveis transcricionais relativos por PCR em tempo real.

Genes	Sequencias (5'-3')	Tamanho do Fragmento (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)	Sequencia de Referência (RefSeq)
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

3.14 NORMAS DE BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos *in vitro* e *in vivo*, envolvendo manuseio dos parasitas, do cultivo de células infectadas, dos animais e de reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por (RICHMOND; MCKINNEY, 2001).

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata, cada um com três réplicas. A quantificação da carga parasitária foi analisada pelo teste *Kruskal Wallis*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunnett*, e os níveis transcricionais foram analisados pelo teste *one-way ANOVA*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Turkey* foram realizados utilizando *GraphPad Prism* versão 6.00 para *Windows*, *GraphPad Software*, La Jolla, Califórnia, EUA. O nível de significância foi estabelecido quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 NOVA FORMA DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE *T. cruzi*

4.1.1 Pesquisa e seleção de iniciadores utilizados para a quantificação do *T. cruzi* descrito em pesquisas anteriores

Após uma pesquisa no PubMed foram selecionados iniciadores usualmente utilizados em trabalhos com qPCR para quantificar *T. cruzi* (Tabela 2). S35 / S36 (fw 5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3' e rv 3'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-5') amplificando uma sequência de 330 pb do DNA do cinetoplasto (kDNA), TCZ1/TCZ2 (fw 5'-GCTCTTGCCCACACGGGTGC-3' e rv 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-5') amplificando uma sequência de 188 pb a partir da sequência nuclear (N) e D71/D72 (fw 5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3' e rv 5'-TTTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3'), amplificando um fragmento de 105 ou 123 pb de RNAr 24Sα, correspondendo aos grupos filogenéticos TCI e TCII do *T. cruzi*, respectivamente (SOUTO, 1996).

TABELA 2: INICIADORES SELECIONADOS NO PUBMED.

INICIADORES	ARTIGOS	MÉTODO	AMOSTRA ALVO
S35/S36	(STURM et al., 1989)	PCR	Cultura axênica
	(VALLEJO et al., 1999)	PCR	<i>Rhodnius prolixus</i> <i>Mus musculus</i> (Balb / c)
	(PAVIA et al.)	PCR	<i>Rhodnius colombiensis</i>
	(BARRERA et al., 2008)	PCR	<i>Mus musculus</i> (Tecido de coração)
	(FERNANDES et al., 2009)	PCR	<i>Homo sapiens</i> (Sangue)
	(PAVÍA et al., 2011)	PCR	<i>Homo sapiens</i> (Sangue/ Biópsias endomiocárdicas)
TCZ1/TCZ2	(QVARNSTROM et al., 2012)	NESTED - qPCR	<i>Homo sapiens</i> (Sangue, tecido de coração, cordão umbilical, tecido de pele)
	(MOSE; KIRCHHOFF; DONELSON et al., 1989)	PCR	<i>Homo sapiens</i> and <i>Mus musculus</i> (Sangue)
	(PIRON et al., 2007a)	NESTED - qPCR	<i>Homo sapiens</i> (Sangue)
	(PARIS et al., 2009)	PCR	<i>Homo sapiens</i> (Sangue)
	(ELOY; LUCHEIS, 2012)	PCR	<i>Canis familiaris</i> and <i>Felis catus</i>

			(Hemocultura)
	(CASTRO-SESQUEN et al., 2013)	PCR	<i>Guinea pig</i> (Sangue e tecido de coração)
	(BRAZ et al., 2008)	PCR	<i>Triatoma infestans</i> (Manchas de fezes secas)
	(SCHIJMAN et al., 2011)	PCR	<i>Homo sapiens</i> (Sangue)
S35/S36 TCZ1/TCZ2	(SABINO et al., 2015)	qPCR	<i>Homo sapiens</i> (Sangue)
	(CUMMINGS; TARLETON, 2003)	qPCR	<i>Mus musculus</i> (Tecidos do coração)
	(VIRREIRA et al., 2006)	PCR / qPCR	<i>Homo sapiens</i> (Líquido amniótico)
	(VIRREIRA et al., 2003)	PCR	<i>Homo sapiens</i> (Sangue de recém-nascido)
	(VIRREIRA et al., 2005)	PCR	<i>Homo sapiens</i> (Sangue de recém-nascido)
D71/D72	(BURGOS et al., 2007)	PCR	<i>Homo sapiens</i> (Sangue)
	(SOUTO; ZINGALES, 1993)	PCR	<i>Leishmania, Trypanosoma rangeli</i> and <i>Homo sapiens</i> (RNA)
	(FERNANDES et al., 1998)	PCR	Cultura axênica
	(D'AVILA et al., 2009)	PCR	<i>Homo sapiens</i> (Hemocultura)
	(SOUTO et al., 1996)	PCR	Cultura axênica
	(FREITAS et al., 2005)	NESTED - qPCR	<i>Homo sapiens</i> and <i>Mus musculus</i> (Tecido de coração, esôfago e cólon)

Na busca de reatividade cruzada com intra e interespecies utilizando a ferramenta Primer_BLAST, retornou que TCZ1 / TCZ2 amplificam quatro sequências diferentes em *T. cruzi* (572pb, 377pb, 377pb e 182pb) e também mostrou reatividade cruzada com outros organismos, tais como *Mus musculus*, *Trichomonas vaginalis* e *Homo sapiens*. S35 / S35 amplificam 6 sequências diferentes de *T. cruzi* (1043pb, 692pb, 691pb, 340pb, 321pb e 320pb) e também mostrou reatividade cruzada com *Mus musculus* e *homo sapiens*, e D71 / D72, amplificou somente 105pb e 123pb de TCI e TCII de *T. cruzi*, e finalmente, não foi encontrada reatividade cruzada com outras espécies (Tabela 3).

TABELA 3: PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO E REAÇÃO CRUZADA DOS INICIADORES.

INICIADORES	NÚMERO DE ACESSO	TAMANHO (pb)	REGIÃO	REATIVIDADE CRUZADA
S35/S36 (STURM et al., 1989)	X04680.1	1043pb	123 - 1165	<i>Homo sapiens</i> <i>Gallus gallus</i> <i>Mus musculus</i>
		692pb	123 - 814	
		691pb	475 - 1165	
		340pb	475 - 814	
		321pb	845 - 1165	
		320pb	123 - 442	
TCZ1/TCZ2 (MOSER; KIRCHHOFF; DONELSON et al., 1989)	XM_812413.1	572pb	302 - 873	<i>Trichomonas vaginalis</i> <i>Homo sapiens</i>
		377pb	302 - 678	
		377pb	497 - 873	
		182pb	497 - 678	
D71/D72 (SOUTO; ZINGALES, 1993)	AY367122.1	105pb	1 - 105	Não possui
	AY367120.1	123pb	1891 - 2013	

4.1.2 Iniciadores com base em fragmento do gene P21 (xm_812182.1) foram específicos para o dna de *T. cruzi*

Os iniciadores foram criados com a ferramenta PrimerQuest voltada para a região de *T. cruzi* denominada P21 (SILVA, DA et al., 2009), com código de acesso ao banco de dados *on line* de sequências de nucleotídeos: XM_812182.1 (98-162) foram: P21fw (5'-AACGCCACC ATCAATCTTTTG -3'), P21rv (5'-CGTCGCATTTCCTCATTCTTC-3'), que resulta na amplificação de fragmento de 65 pares de base *T. cruzi* (Tabela 4).

Na busca de reatividade cruzada com outras espécies (*Mus musculus*, *Homo sapiens* e *Trypanosomatidae*), utilizando a ferramenta Primer_BLAST, não houve nenhum retorno, portanto, consideramos os iniciadores específicos para *T. cruzi*.

TABELA 4: INICIADORES SELECIONADOS PARA *Trypanosoma cruzi* (XM_812182.1).

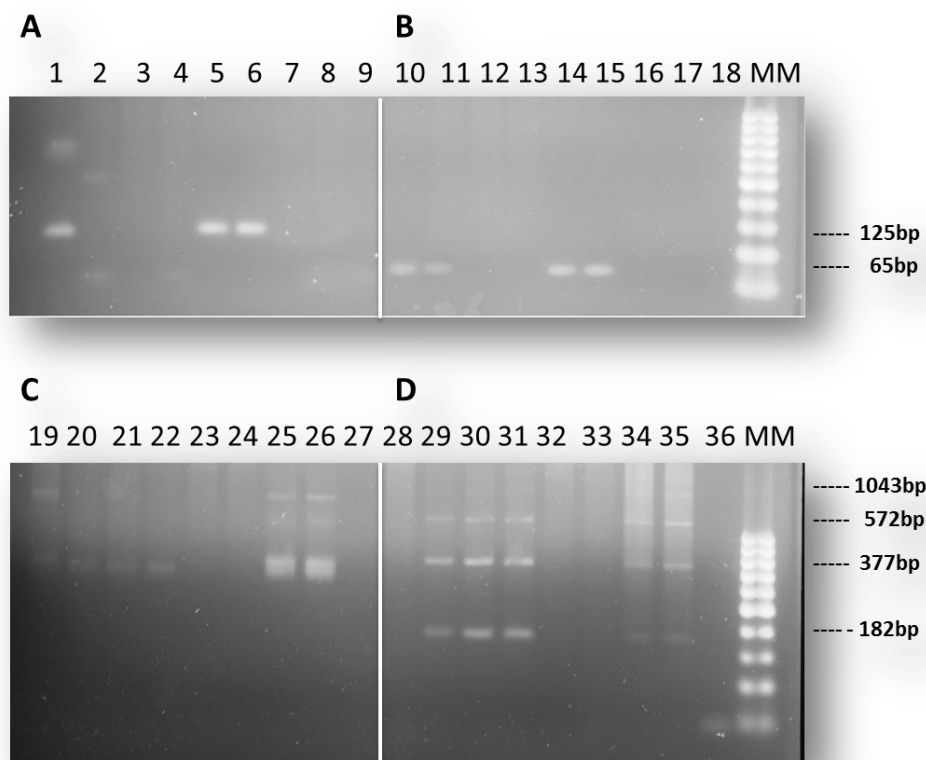
Iniciadores	Sequencia (5'→3')	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento. (°C)
P21fw	AACGCCACCATCAATCTTTTG	65	58
P21rv	CGTCGCATTCTCATTCTTC		

>gi|71657520|ref|XM_812182.1| Trypanosoma cruzi strain CL Brener hypothetical protein Tc00.1047053509767.140 partial mRNA
 ATGCGATTTGTTTTTTTTCTTCTCGTCCTTTTTCTCGCCTGCAGCGTGTGGCCGAGGAGGTGGT
 GAATCGGGGATACAACCACAAGGAGCCCCATAAACGCCACCATCAATCTTTTGACGCCATCGTC
 ATGTGCGCAGGGAAGAAATGAGGAATGCGACGGGGTGGGATGCAGAGGAGAGATAATTCGGT
 ACTGCCAAACCCCGTCACCGGCTTCTACGAGTACTGGTGGAAAGTGTCTTCCGAAAATATGGAC
 CGGTTTCAGCACGCCCGACTGCCAGACGTACATAAATGGCATGATTGCCTGCAGGAACTTTACCG
 TTTCTTCTACGGTCCAGGGGAGCAGTCTCCAGACGGGTTGGTGAAGCACCTGCTTCATTAGAA
 AACGAGTCGATCCCCAACGAATGCAGGAACTCCAGATTCTACAAAGATGCCGTGGTTGGATTCCA
 CAGACGCCAGTAA

4.1.3 Comparação entre os perfis moleculares de cada par de iniciadores por reação em cadeia da polimerase (PCR convencional)

Observou-se que a amplificação de DNA com D71 / D72 (Figura 4A), S35 / S36 (Figura 4C) e TCZ1 / TCZ2 (Figura 4D) geraram vários fragmentos de DNA de *T. cruzi*, e amplificação não específica em mioblastos e tecidos não infectados. A amplificação com os iniciadores P21fw / P21rv geraram apenas um fragmento amplificado em amostras de DNA de mioblastos e de tecido de coração de camundongo infectado, e não houve nenhuma amplificação não específica nas amostras não infectadas (Figura 1B).

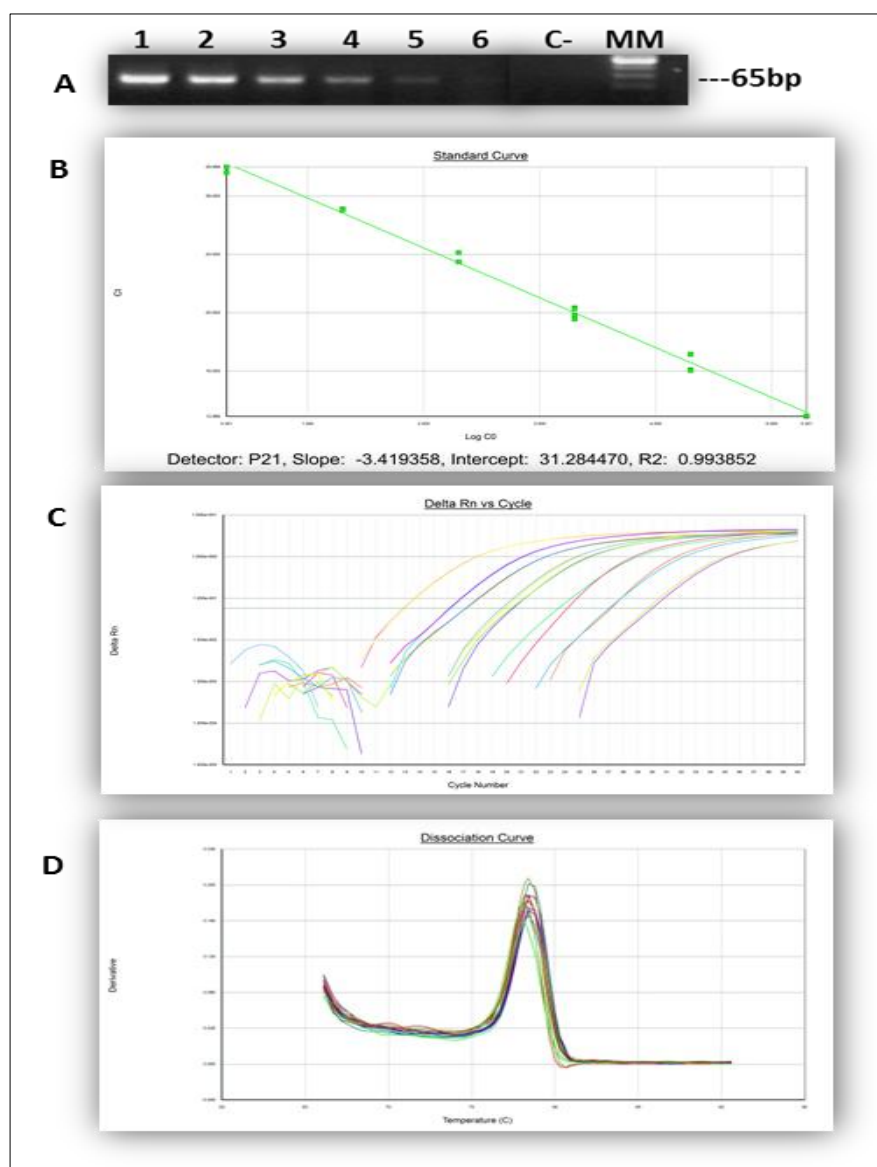
FIGURA 4: Amplificação de DNA por PCR de *T. cruzi*. (A) D71 / D72; (B) P21fw / P21rv; (C) S35 / S36; E (D) TCZ1 / TCZ2. 1, 2, 10, 11, 19, 20, 28 e 29: tecido de coração de camundongo infectado com *T. cruzi*; 3, 4, 12, 13, 21, 22, 30 e 31: tecido de coração de camundongo não infectado; 5, 6, 14, 15, 23, 24, 32 e 33: C2C12 infectados por *T. cruzi*; 7, 8, 16, 17, 25, 26, 34 e 35: somente C2C12; 9, 18, 27 e 36: controle negativo; MM: padrão de peso molecular de 50pb.



4.1.4 Especificidade e sensibilidade do pcr quantitavo em tempo real (qPCR) para a detecção de *T. cruzi*

O resultado da PCR convencional (Fig. 5A) e da análise da curva de dissociação de qPCR em tempo real indicaram que o produto era uma banda única discreta, sem produtos não específicos. Uma diluição em série de DNA, a partir de cultura de *T. cruzi* (para ensaios *in vitro*) e de tecido de coração de camundongos infectados por *T. cruzi* (para ensaios *in vivo*) foram utilizadas para gerar curva padrão (Fig. 5B). A eficiência da reação de qPCR foi 96,84%. Amostras infectadas apresentaram curvas de amplificação semelhante e quase no mesmo valor do ciclo limiar (Fig. 5C). A análise da curva de dissociação mostrou um pico único de absorção em $78,3 \pm 0,3$ ° C (Fig. 5D), o que indica uma elevada especificidade do produto de amplificação.

FIGURA 5: (A) Produto de pcr convencional de *Trypanosoma cruzi* usando iniciadores P21fw / P21rv; (B) curva padrão para a PCR quantitativa gerado 6 diluições em série; (C) curvas de amplificação por PCR em tempo real; (D) curva de dissociação.



A quantificação foi realizada (Tabela 5) e a sensibilidade e reprodutibilidade do ensaio de qPCR em tempo real foi avaliada usando amostras de DNA de mioblastos e de coração de camundongos infectados com *T. cruzi* (C +) e também não infectados (C -). Valores médios de amostras com 2 parasitas (CT $29,8 \pm 0,3$) em três experimentos separadas indicaram que o DNA pode ser detectado de forma

estável. As amostras não infectadas (C -) amplificaram inespecificamente a partir do CT $33,2 \pm 1,3$ e Tm de $77,8 \pm 0,2$.

TABELA 5: Especificidade e sensibilidade do PCR quantitativo para detectar *T. cruzi*.

	Amostra	CT	Média CT	Desv pad	Quantificação	Média Quantificação	Tm °C
Curva Padrão	1	12,9	12,9	0,0	2E+05		78,4
		12,9			2E+05		78,4
	2	17,2	17,2	0,0	2E+04		78,4
		17,1			2E+04		78,4
	3	20,3	20,3	0,1	2E+03		78,4
		20,3			2E+03		78,4
	4	23,5	23,8	0,4	2E+02		78,4
		24,1			2E+02		78,4
	5	27,1	27,1	0,1	2E+01		78,2
		27,0			2E+01		78,2
	6	30,0	29,8	0,3	2E+00		77,9
		29,6			2E+00		77,6
C+ (50 mg tecido + <i>T. cruzi</i>)	21	28,2	28,2	0,1	8,0	8,2	78,2
		28,2			7,9		78,2
		28,1			8,6		78,2
C- (50 mg tecido)	22	34,3	34,2	0,3	0,1	0,1	77,9
		34,5			0,1		77,9
		33,8			0,2		77,9
C- (25 mg tecido)	23	32,4	32,3	0,2	0,5	0,5	77,9
		32,2			0,5		77,9
		32,5			0,4		77,9
C- (13 mg tecido)	24	32,0	32,2	0,9	0,6	0,6	77,9
		31,4			0,9		77,6
		33,2			0,3		77,3
C+ (C2C12 + <i>T. cruzi</i>)	37	18,9	19,1	0,2	4100,4	3679,2	78,4
		19,0			3883,8		78,4
		19,4			3053,5		78,2
C- (C2C12)	36	32,9	33,9	1,79	0,3	0,2	77,6
		36,0			0,0		77,6
		32,9			0,3		77,9

4.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS TRANSCRICIONAIS DE GENES RELACIONADOS À ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO E REPARO DE MEMBRANA PLASMÁTICA

4.2.1 Especificidade dos iniciadores utilizados no RT-qPCR mediante a curva de dissociação

Para o início da construção dos iniciadores, as sequências dos transcritos (mRNA) foram analisadas utilizando o programa BLAST (<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* (T_m). Na tabela 6 estão os resultados da validação dos iniciadores para os genes do estudo, todos os iniciadores utilizados permaneceram dentro dos padrões exigidos para uma reação de RT-qPCR, assim como o valor R^2 de 99%.

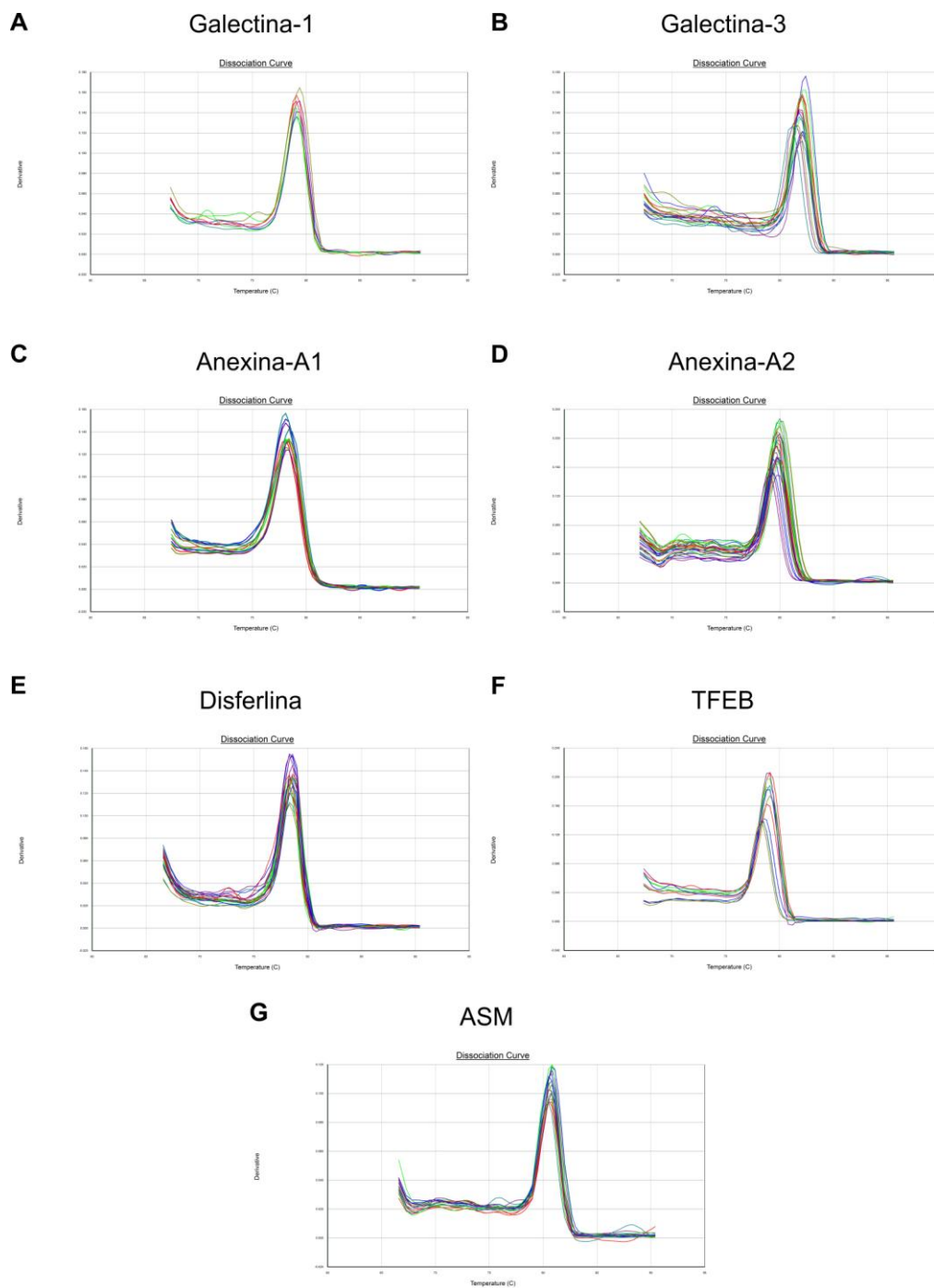
TABELA 6: validação dos iniciadores para a RT-qPCR.

GENE	*SLOPE	EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO	** R^2	EFICIÊNCIA DOS INICIADORES (%)
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 a eficiência da reação (Slope) segundo a Applied Biosystem. ** coeficiente de correlação linear (R^2).

A especificidade dos oligonucleotídeos foi verificada pela curva de dissociação gerada posteriormente a reação de RT-qPCR. Os diversos picos obtidos com iniciadores 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.

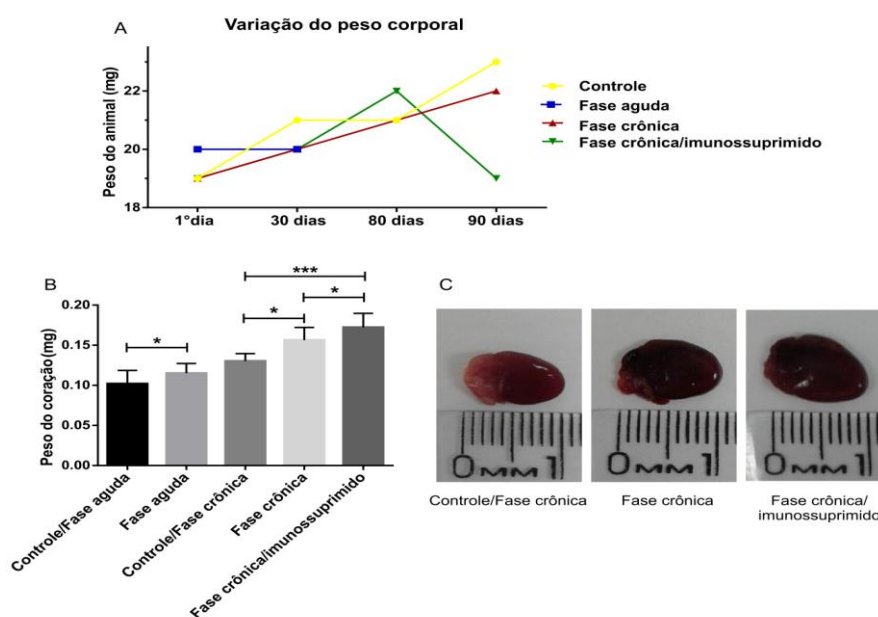
FIGURA 6: Curva de dissociação gerada pela RT-qPCR. Picos obtidos na curva de dissociação ou “curva de melting” gerada pelo RT-qPCR; Galectina 1 (A); Galectina 3 (B); Anexina A1 (C); Anexina A2 (D); Disferlina (E); TEFB (F) e ASM (G). Picos únicos demonstram especificidade para cada amplificação.



4.2.2 A infecção por *T. cruzi* durante as fases aguda, crônica e imunossupressão da fase crônica, promoveu mudanças em relação ao peso corporal e do coração em camundongos.

Durante a infecção experimental, observamos mudanças no peso corporal de camundongos infectados comparado ao grupo controle. Camundongos em fase aguda não ganharam peso em comparação com animais não infectados da mesma idade. Com o estabelecimento e a evolução da infecção para a fase crônica os animais recuperaram a capacidade de ganhar peso. Quando os animais foram expostos à imunossupressão na fase crônica, tiveram perda de peso significativa em comparação com os animais em fase crônica não imunossuprimidos. Quando os camundongos são imunossuprimidos em fase crônica foi observada a perda de peso significativa, em comparação com os animais na fase crônica não imunossuprimidos (Figura 7A). Além da variação do peso corporal, observou-se um aumento significativo no peso do coração em diferentes fases de infecção, em comparação com os controles. Ocorreu um aumento relevante para o peso do coração de animais imunossuprimidos quando comparado com os não imunossuprimidos em fase crônica (Figura 7B). Imagens representativas das mudanças do tamanho do coração (Figura 7C).

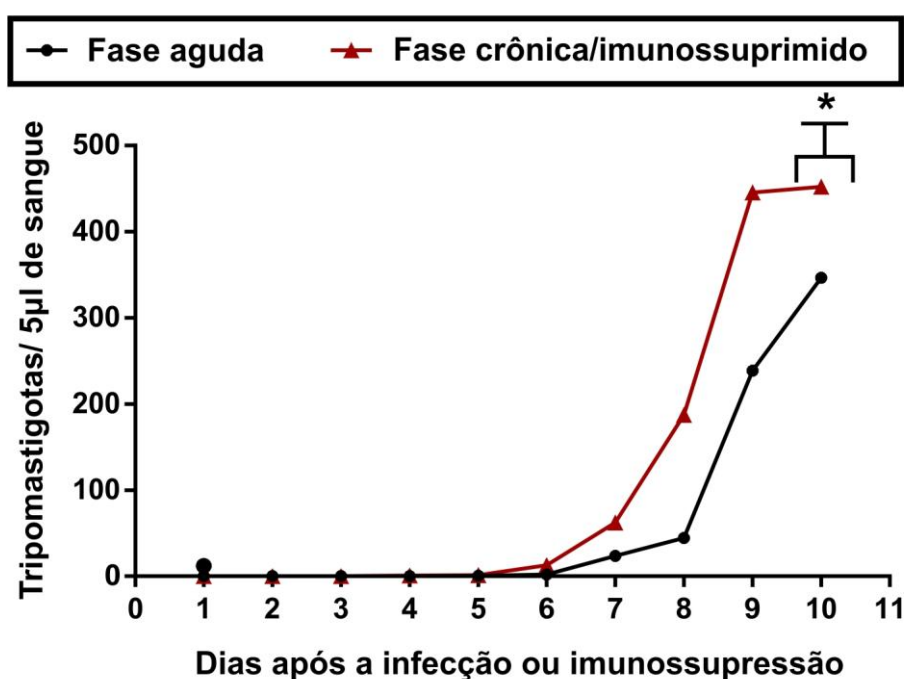
FIGURA 7: Parâmetros de peso corporal e do coração de animais infectados pelo *T. cruzi*. (A) Peso dos animais durante o estudo e em diferentes estágios da doença. (B) Peso do coração dos animais. (C) Tamanho dos corações de camundongos em diferentes estágios da doença. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.



4.2.3 As diferenças entre a parasitemia na fase aguda e após imunossupressão na fase crônica da infecção experimental.

Durante a infecção experimental foi observado um aumento significativo na carga parasitária no sangue dos animais durante a imunossupressão de animais crônicos, quando comparado com a parasitemia na fase aguda. Observou-se também uma parasitemia inicial em animais imunossuprimidos em comparação com animais expostos somente à infecção primária (Figura 8).

FIGURA 8: Parasitemia durante a fase aguda e após imunossupressão na fase crônica.

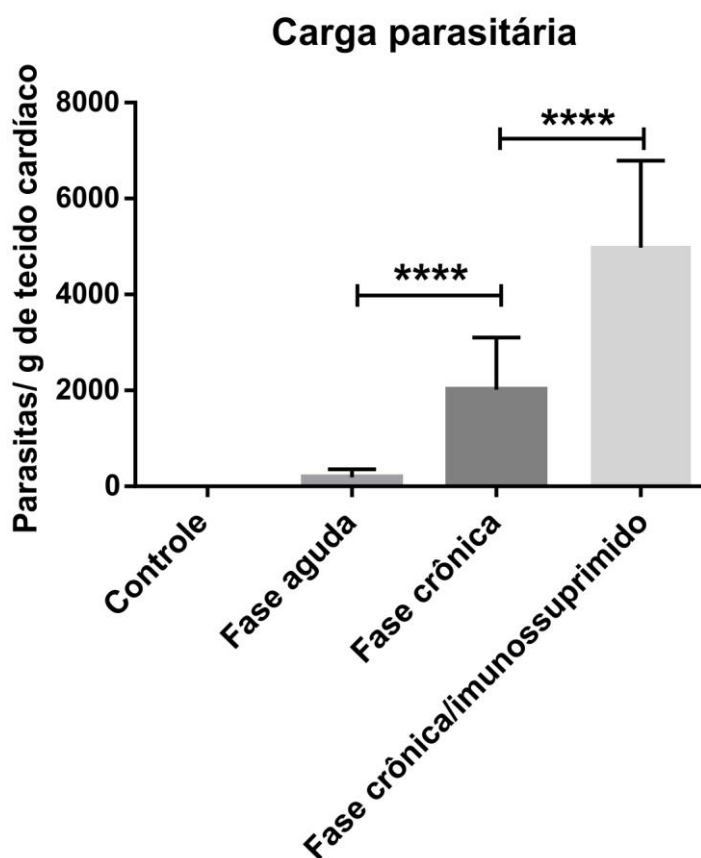


4.2.4 A imunossupressão na fase crônica promove um incremento na carga parasitária no tecido cardíaco.

Durante a cinética da infecção foram analisadas amostras de tecido do coração para verificar a carga parasitária. Foram encontradas cópias de DNA do parasita em todas as situações de infecção em camundongos em fase crônica, porém essa quantidade é significativamente maior do que o encontrado na fase aguda. Um outro aumento da carga de parasitas foi evidenciado quando um grupo

de camundongos em fase crônica de infecção foi imunocomprometido, em comparação com animais de mesma fase, estes dados sugerem que a recaída aguda da infecção promoveu a ativação da forma latente do parasita, e como resultado, há uma exacerbação do número de parasitas no tecido (Figura 9).

FIGURA 9: Quantificação da carga parasitária no tecido animal infectado durante as diferentes fases da infecção e após a imunossupressão. **** $P < 0,0001$.

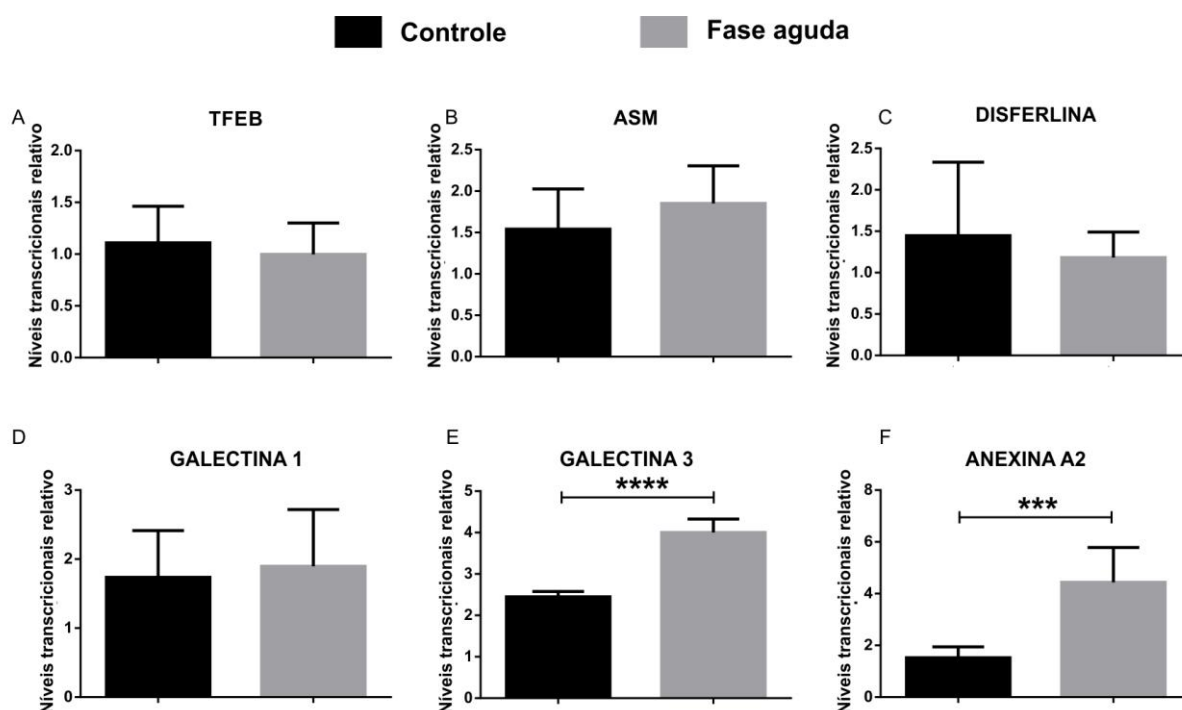


4.2.5 Fase aguda da infecção promove um aumento significativo na expressão gênica de proteínas envolvidas na organização do citoesqueleto.

O RNA de tecido de camundongo na fase aguda da infecção e de camundongos não infectados (controle) foi extraído para quantificar a expressão do gene TFEB, ASM, Disferlina, Galectina 1, Galectina 3 e Anexina A2. Não houve diferença significativa nos níveis transcricionais da expressão de TFEB, ASM,

Disferlina e Galectina 1 quando comparados ao controle (Figura 10 A-D). No entanto, observou-se um aumento significativo nos níveis transcrpcionais da expressão da Galectina 3 e Anexina A2 de animais infectados durante a fase aguda (Figura 10 E e F).

FIGURA 10: Níveis transcrpcionais em tecido cardíaco de camundongos na fase aguda. Nível de expressão relativa (A) TFEB, (B) ASM (C) Disferlina (D) Galectina 1 (E) Galectina 3 (F) Anexina A2, quando comparado com a expressão de genes em animais dos grupos controle. *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

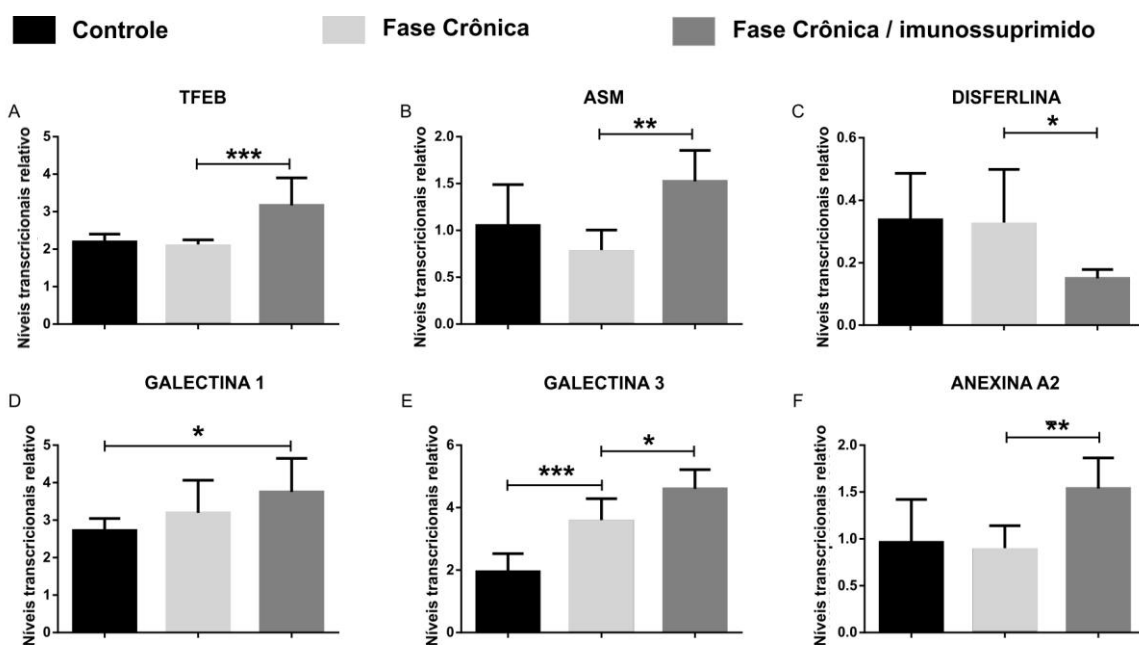


4.2.6 Na fase crônica da infecção e após a imunossupressão ocorre alteração dos níveis transcrpcionais no tecido cardíaco.

Avaliando os níveis transcrpcionais no tecido do coração de camundongos durante a fase crônica da infecção experimental, detectamos que apenas Galectina 1 estava sendo expressa diferencialmente quando comparada ao grupo controle (Figura 11D). Para se observar os efeitos da imunossupressão na modulação da expressão gênica, nós comparamos os níveis relativos de expressão deste grupo com um grupo de animais em fase crônica não imunossuprimidos. Encontramos um aumento significativo nos níveis de TFEB, ASM, Galectina 1, Galectina 3 e Anexina

A2 nos camundongos imunossuprimidos, em comparação com o grupo imunocompetente (Figura 11 A, B, E e F respectivamente). Além disso, tiveram uma diminuição de expressão de Disferlina (Figura 11C), após imunossuprimidos, quando comparado com a expressão gênica em animais de fase crônica não imunossuprimidos.

FIGURA 11: Níveis transcripcionais em tecido cardíaco de animais em fase crônica imunossuprimidos. (A) TFEB, (B) ASM, (C) Disferlina (D) Galectina 1 (E) Galectina 3 (F) Anexina A2 nos diferentes grupos de fase crônica. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.



5 DISCUSSÃO

5.1 NOVA FORMA DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE *T. cruzi*

Ensaio moleculares têm sido amplamente utilizados para o diagnóstico, monitoramento da progressão e o resultado da terapia na doença de Chagas (UMEZAWA et al., 1999; LUQUETTI et al., 2003; DUFFY et al., 2009; YUN et al., 2009; BRITTO, 2009; SCHIJMAN et al., 2011).

O diagnóstico baseia-se na demonstração dos parasitas em aspirados de tecidos ou sangue, a detecção de anticorpos contra os parasitas, a detecção de produtos do parasita no sangue ou secreções corporais, ou a detecção quantitativa / qualitativa de DNA do parasita. Dois resultados positivos a partir de qualquer um destas 3 técnicas convencionais são recomendados para um diagnóstico final, mas os métodos atuais de diagnóstico para doenças causadas por tripanossomatídeos não são satisfatórios (“Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis.” 2012).

A detecção quantitativa / qualitativa de DNA do parasita com a reação em cadeia da polimerase (PCR) é mais sensível do que os outros métodos parasitológicos e, portanto, poderia ser útil para confirmar o diagnóstico em casos de sorologia inconclusiva e como método auxiliar para monitorar o tratamento. O método da PCR pode identificar a falha do tratamento por meio da detecção positiva do DNA de *T. cruzi*, no entanto, não é utilizado no diagnóstico de rotina por causa da má padronização, potencial contaminação cruzada de DNA, grande risco de resultados falso-positivos, resultados variáveis entre laboratórios e países (PIRON et al., 2007b; QVARNSTROM et al., 2012; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é uma plataforma de análise altamente sensível que fornece especificidade de detecção elevada em comparação com outras plataformas, quando segue os parâmetros ideais de padronização (CECILIA et al., 2015; CHAN et al., 2015).

Embora até hoje não exista um padrão ouro para a detecção da infecção por *T. cruzi* em amostras biológicas por PCR em tempo real, existem muitos trabalhos publicados que realizam qPCR utilizando os iniciadores S35/S36, TCZ1/TCZ2

(MOSER; KIRCHHOFF; DONELSON et al., 1989) e D71 / D72 (STURM et al., 1989; SOUTO; ZINGALES, 1993), porém esses iniciadores foram desenhados para PCR convencional (anteriormente ao início do uso da plataforma de PCR quantitativo em tempo real) e específicos para a amplificação do DNA de *T. cruzi* em cultura.

De acordo com os parâmetros analíticos ideais para o qPCR (BUSTIN; BENES; GARSON et al., 2009), quando se trabalha com *SYBRgreen*, deve-se utilizar iniciadores que amplifiquem fragmentos de até 150 pb, para que não ocorra a formação de dímeros de iniciadores. Isto é porque *SYBRgreen* é um intercalante de DNA de dupla fita, e por conseguinte, quanto maior for a quantidade de DNA de dupla fita na amostra, maior é a probabilidade de amplificações inespecíficas, causando, assim, uma falsa amplificação do DNA de interesse, por conseguinte, um falso positivo.

Uma forma de distinguir um falso positivo de um positivo verdadeiro é o estudo da temperatura de *melting* (T_m) (XANTHOPOULOU et al., 2016; SCHMIDT; HULKKONEN; NAUE et al., 2016), em que T_m é utilizado para diferenciar as sequências de DNA diferentes, isto é, quando comparado com um controle positivo, as amostras a ser avaliadas deve ter o mesmo T_m (mesmo com quantificação diferente). Se não tiver, deve-se considerá-los como um falso-positivo.

Os iniciadores P21fw / P21rv encaixam-se perfeitamente em parâmetros ideais para o uso do qPCR em tempo real, e quando comparado com os iniciadores S35 / S36, TCZ1 / TCZ2 e D71D72 são a melhor escolha, porque amplificam uma única sequência de DNA menor que 150 pb em amostras de tecidos infectados e, não possuem nenhuma reatividade cruzada com quaisquer outras espécies, sendo considerada uma grande ferramenta para a quantificação de *T. cruzi* em amostras de tecido de coração de camundongo (*in vivo*) e mioblastos (*in vitro*).

5.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS TRANSCRICIONAIS DE GENES RELACIONADOS À ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO E REPARO DE MEMBRANA PLASMÁTICA

5.2.1 Retorno de parasitemia e maior carga parasitária no tecido cardíaco em fase crônica após imunossupressão

Em nosso trabalho observamos o aumento no número de parasitas e parasitemia em animais crônicos que foram imunossuprimidos. Resultados semelhantes associando parasitemia com reativação da infecção por *T. cruzi* pela imunossupressão, seja pelo uso de drogas ou por doenças que imunocomprometem o paciente também foram encontrados (SARTORI et al., 2002; DUFFY et al., 2009; FREITAS, DE et al., 2011). Pacientes chagásicos crônicos, quando imunossuprimidos pela infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) voltam a possuir parasitemia (SARTORI et al., 2002; DUFFY et al., 2009; FREITAS, DE et al., 2011). Pacientes chagásicos em fase terminal que receberam drogas imunossupressoras após transplante cardíaco também sofreram o retorno da parasitemia (SARTORI et al., 2002; DUFFY et al., 2009b; FREITAS, DE et al., 2011).

A imunossupressão causada por doenças auto-imunes (infecção por HIV / SIDA, doença neoplásica, e doença auto-imune sistêmica) e imunossupressão causada por drogas em pacientes com infecção por *T. cruzi*, leva a um aumento na quantificação de *T. cruzi* nos indivíduos infectados (PINAZO et al., 2013), e um aumento da parasitemia através da reativação da infecção pode ser detectada por parasitologia direta e / ou técnicas de PCR, mesmo na ausência de sintomas clínicos, e deve ser considerado a característica definidora mais importante de reativação, porque, geralmente, aumenta antes do início dos sintomas (LATTES; LASALA, 2014)

A reativação pode ser uma consequência inevitável do tratamento imunossupressor. Existem casos de pacientes que não tinham conhecimento de ser portador da doença de Chagas e apresentaram reativação após a terapia imunossupressora instituída para tratar doenças de pele. Pacientes com infecção por *T. cruzi* que precisam de terapia imunossupressora deve, portanto, ser seguido de perto, e ainda, tratamento com benzonidazol ou nifurtimox é fortemente recomendado em casos de reactivação confirmada (BURGOS et al., 2012; PINAZO et al., 2013). O uso de corticoide na doença de Chagas foi associada ao aumento da

parasitemia, porém o uso de benzonidazol concomitante ao tratamento com corticoide impediu a parasitemia, sendo sugerido que pacientes imunocomprometidos com doença de Chagas crônica utilizem corticoide concomitantemente com benzonidazol, para que não ocorra o agravamento da doença de Chagas (RASSI et al., 1999).

Em um trabalho publicado de estudo de caso, foi relatado que uma criança tratada com dexametasona demonstrou maior taxa de parasitemia, o que parece estar relacionado com doses mais elevadas de corticosteroides (TRESOLDI et al., 1984).

De acordo com o exposto acima, esses estudos citados corroboram nosso estudo quando foi observado o retorno da parasitemia e o aumento significativo da carga parasitária em tecidos cardíacos, especialmente depois de imunossupressão por dexametasona em fase crônica, o que demonstra que a reativação pode modificar o processo natural de infecção.

5.2.2 Aumento na expressão gênica de Galectina 3 e Anexina A2 na fase aguda, crônica e após imunossuprimidos de infecção.

Em nosso trabalho observamos que houve aumento significativo na expressão gênica da Galectina 3 e Anexina A2 de animais infectados durante a fase aguda, em fase crônica e após imunossupressão, quando comparado com controles de animais de mesma idade não infectados. Moléculas de superfície do *T. cruzi* interagem com a Galectina 3 e modulam a interação do parasita com a laminina de forma lactose dependente, dessa forma, o aumento da expressão da Galectina 3 é favorável para a infecção por *T. cruzi*, pois o parasita utiliza a Galectina 3 para aderir e entrar no hospedeiro (MOODY; OCHIENG; VILLALTA et al., 2000)

A Galectina 3 expressa em células B, é super expressa durante a infecção por *T. cruzi* em camundongos (ACOSTA-RODRÍGUEZ et al., 2004; VRAY et al., 2004). O fato de que a Galectina 3 é secretada por macrófagos e por outras células, incluindo células de artérias coronárias humanas de músculo liso, sugere que a Galectina 3 modula a infecção (KLESHCHENKO et al., 2004). Galectina 3 também é encontrada em torno do vacúolo parasitóforo (ARAÚJO et al., 2009; REIGNAULT et al., 2014) e ao redor de parasitas após a fuga do vacúolo parasitóforo (MACHADO et al., 2014). Galectina 3 está fortemente envolvida na doença de Chagas, não só na

resposta imune contra o *T. cruzi*, mas também na mediação de danos no tecido cardíaco, porque é a regulação da expressão específica de receptores do tipo toll (TLR: *toll-like receptors*) durante a infecção por *T. cruzi* que orchestra respostas inflamatórias contra o parasita, e também medeia a infiltração de macrófagos e linfócitos em corações chagásicos para induzir a fibrose e subsequente lesão cardíaca (PINEDA et al., 2015). Dessa forma, a Galectina 3 parecem ser importante na relação parasita-hospedeiro durante a infecção pelo *T. cruzi*, pois está envolvido na internalização de tripomastigotas e no processo de adesão celular.

Galectina 3 e Anexina A2 (GABEL et al., 2015; SHETTY et al., 2015) são proteínas envolvidas na dinâmica da membrana plasmática e na cicatrização celular (BANDOROWICZ-PIKULA; WOS; PIKULA et al., 2012; LAURITZEN; BOYE; NYLANDSTED et al., 2015). A importância da Anexina A2 na relação hospedeiro-parasita foi demonstrada pelo fato de células *knockout* para a Anexina A2 apresentarem importante redução da invasão de células por amastigotas extracelulares. Em contraste, a ausência da expressão de Anexina A2 favorece a multiplicação intracelular desses amastigotas extracelulares (TEIXEIRA et al., 2015). Foi demonstrado que a Anexina A2 favorece a remodelação dinâmica da actina na vizinhança das membranas celulares (GRIEVE; MOSS; HAYES et al., 2012). Neste contexto, a ausência da expressão de Anexina A2 pode ter desorganizado o citoesqueleto de actina, o que permitiria maior multiplicação do parasita nas células *knockout* em comparação com as do tipo selvagem. Por conseguinte, uma remodelação intacta, rígida, e rapidamente do citoesqueleto facilita as fases iniciais da invasão e retenção de *T. cruzi*, seguido de amolecimento e a subsequente desmontagem do citoesqueleto para acomodar a replicação intracelular do parasita (MOTT et al., 2009).

5.2.3 Expressão de genes na fase crônica da infecção e após a imunossupressão

No nosso trabalho observamos um aumento significativo na expressão gênica da Galectina 3 e Anexina A2 de animais infectados durante as fases aguda e crônica e após imunossupressão na fase crônica, quando comparado com controles de animais não infectados. A cardiopatia chagásica crônica representa uma remodelação do sistema cardiovascular, que se manifesta como denervação cardíaca e infiltrado mononuclear intersticial. Miócitos e alterações degenerativas

vasculares, fibrose e hipertrofia caracterizar as principais características patológicas da cardiopatia chagásica crônica (PRETO et al., 2015; TORREÃO, 2015; “WHO,” 2016). Como relatado anteriormente, a imunossupressão na doença de Chagas leva à reativação da infecção que provoca o aumento da parasitemia e a quantidade de parasitas no tecido, e estudos anteriores demonstraram que durante a invasão por *T. cruzi* há uma indução de um aumento da atividade lisossômica que é essencial para o estabelecimento e diferenciação de parasita (FERNANDES et al., 2011). Durante a invasão, há um processo de lesão da membrana plasmática, que induz a exocitose de lisossomas reguladas por cálcio e tem a mesma função de reparação. Vários estudos demonstram a atividade de TFEB como chave para o estabelecimento do parasita na célula hospedeira através de funções tais como exocitose lisossomal, formação do fagossomo, reparo da membrana e autofagossomo (SARDIELLO et al., 2009b; SETTEMBRE; BALLABIO, 2011; SPAMPANATO et al., 2013). Neste contexto, este fator tem um papel fundamental para o processo de reparação da membrana celular mediada pelo TFEB. Durante a internalização do parasita no interior da célula, o cálcio iônico provoca a fusão dos lisossomos com a membrana exterior no lugar onde este parasita invadiu liberando a ASM, que por sua vez induz a formação de ceramida para ajudar no processo de reparação das regiões da membrana lesionadas, promovendo também a entrada e estabelecimento do parasita (TAM et al., 2010; FERNANDES et al., 2011; DEFOUR et al., 2014).

A Disferlina é uma proteína que está relacionada com o reparo da membrana após uma lesão muscular, e em um papel direto, pode permitir a sobrevivência das células lesadas (BANSAL et al., 2003; LENNON et al., 2003; MCNEIL; KIRCHHAUSEN, 2005; GLOVER; BROWN, 2007). O parasita *T. cruzi* possui tropismo por células musculares (NUNES et al., 2013), que são mais propensos a danos. Um estudo sugeriu que o *T. cruzi* pode invadir células utilizando a maquinaria da reparação da membrana plasmática em feridas (FERNANDES; ANDREWS, 2012) e que o tropismo de *T. cruzi* em cardiomiócitos no músculo esquelético está relacionada com a presença da reparação altamente desenvolvida da membrana plasmática nestas células.

Nossos resultados, mostraram diminuição da expressão genica de Disferlina nos animais imunossuprimidos, quando comparados aos animais não imunossuprimidos, na fase crônica. Nós sugerimos que esta diminuição da Disferlina em animais imunossuprimidos ocorre devido a extensão lesão do tecido e como

consequencia grande quantidade de tecido fibrótico, impedindo assim o aumento na expressão de Disferlina. Outros experimentos devem ser realizados, com o objetivo de elucidar o mecanismo de reparo de membrana no tecido cardíaco de animais imunossuprimidos e que tiveram a doença reativada.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que a quantificação por PCR em tempo real utilizando os iniciadores P21fw e P21rv, mostrou ser um novo, específico e sensível método para a detecção de *T. cruzi* em cultura de células e de tecidos de camundongo, sendo assim, considerada como uma potencial ferramenta de diagnóstico para a detecção e quantificação do parasita *T. cruzi*.

A infecção de camundongos por *T. cruzi* aumentou significativamente os níveis transcricionais de Galectina 3 e de Anexina A2 no tecido cardíaco, durante toda cinética experimental.

Já a imunossupressão dos animais e consequente reativação da doença, causou perda de peso e aumento no tamanho e peso do coração. Além disso, provocou parasitemia e aumento da carga parasitária no tecido cardíaco. Por outro lado, a imunossupressão levou a diminuição da expressão de Disferlina no tecido cardíaco após imunossupressão na fase crônica da infecção. Mas, houve aumento significativo dos níveis transcricionais de TFEB, ASM, Galectina 1, Galectina 3 e Anexina A2 nos camundongos imunossuprimidos na fase crônica da infecção.

REFERÊNCIAS

BEM-ABDA, I. et al. Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 105, n. 1, p. 17–22, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926109>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

ACOSTA-RODRÍGUEZ, E. V. et al. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 172, n. 1, p. 493–502, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688359>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

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**, Rio de Janeiro, v. 104 Suppl , p. 76–88, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753462>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **The Journal of experimental medicine**, Tokyo, v. 200, n. 9, p. 1135–43, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2211867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

ANDREWS, N. W. Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. **The Journal of cell biology**, New York, v. 158, n. 3, p. 389–94, 2002. Disponível em: <<http://jcb.rupress.org/content/158/3/389.full>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

ANDREWS, N. W. et al. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: Evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, Cambridge, v. 61, n. 7, p. 1277–1287, 1990. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867490906928>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

ARAÚJO, A. et al. Paleoparasitology of Chagas disease: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 9–16, 2009. Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000900004&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 28 dez. 2015.

BANDOROWICZ-PIKULA, J.; WOS, M.; PIKULA, S. Do annexins participate in lipid messenger mediated intracellular signaling? A question revisited. **Molecular membrane biology**, London, v. 29, n. 7, p. 229–42, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/225305831_Do_annexins_participate_in_lipid_messenger_mediated_intracellular_signaling_A_question_revisited>. Acesso em: 18 dez. 2015.

BANSAL, D. et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. **Nature**, London, v. 423, n. 6936, p. 168–72, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12736685>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

BARRERA, Y. K. et al. [Evaluation of TcH2AF-R and S35-S36 primers in PCR tests for the detection of *Trypanosoma cruzi* in mouse cardiac tissue]. **Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud**, Bogotá, v. 28, n. 4, p. 616–26, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19462567>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

BHATTACHARYYA, T. 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**, New York, v. 40, n. 8, p. 921–8, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20097201>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

BLITTERSWIJK, W. J. VAN. et al. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? **The Biochemical journal**, London, v. 369, n. Pt 2, p. 199–211, 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1223095&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

BRAZ, L. M. A. et al. Suitability of a rapid DNA isolation and amplification for detection of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* dry fecal spots collected on filter paper. **Parasite**, Paris, v. 15, n. 4, p. 595–8, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19202767>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual review of microbiology**, Palo Alto, v. 27, p. 347–82, 1973. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104 Suppl , p. 122–35, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753467>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

BURGOS, J. M. et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. **International journal for parasitology**, New York, v. 37, n. 12, p. 1319–27, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751907001385>>. Acesso em: 18 jan. 2016.

BURGOS, L. G. et al. Reactivation of Chagas disease by immunosuppressive therapy in a patient with systemic lupus erythematosus: report of an exceptional case. **The American Journal of dermatopathology**, New York, v. 34, n. 6, p. e84–9, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22814327>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of molecular endocrinology**, New York, v. 25, n. 2, p. 169–93, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11013345>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, New York, v. 55, n. 4, p. 611–22, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246619>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

CAMPOS DE CARVALHO, A. C. et al. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, Bethesda, v. 2009, p. 484358, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2696023&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

CARVALHO, T. U. DE; SOUZA, W. DE. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 205–212, 1986. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651986000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 4 jan. 2016.

CASTRO-SESQUEN, Y. E. et al. Detection of soluble antigen and DNA of *Trypanosoma cruzi* in urine is independent of renal injury in the guinea pig model. **PLoS one**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e58480, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3592799&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

CAVALCANTI, M. DE P. Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum*. , 2008.

CECILIA, D. et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses. **Archives of Virology**, Wien, v. 160, n. 1, p. 323–327, 2015. Springer Vienna. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00705-014-2217-x>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

CEVALLOS, A. M.; HERNÁNDEZ, R. Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. **BioMed research international**, New York, v. 2014, p. 401864, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4052072&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

CHAN, J. F.-W. et al. Development and Evaluation of Novel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays with Locked Nucleic Acid Probes Targeting Leader Sequences of Human-Pathogenic Coronaviruses. (M. J. Loeffelholz, Ed.) **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 53, n. 8, p. 2722–2726, 2015. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01224-15>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

CHENG, X. et al. Calcium signaling in membrane repair. **Seminars in cell & developmental biology**, London, v. 45, p. 24–31, 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952115002293>>. Acesso em: 2 dez. 2015.

CORREA, S. G. et al. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. **Glycobiology**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 119–28, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626408>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

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**, Oxford, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26572924>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, London, v. 465, p. 6–7, 2010.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 53–59, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685103000938>>. Acesso em: 18 jan. 2016.

D'AVILA, D. A. et al. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 47, n. 6, p. 1718–25, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2691080&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

DEFOUR, A. et al. Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. **Cell death & disease**, London, v. 5, p. e1306, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4079937&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

DUFFY, T. et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 3, n. 4, p. e419, 2009a. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2667272&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

DUFFY, T. et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 3, n. 4, p. e419, 2009b. Public Library of Science. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000419>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1760, n. 4, p. 616–35, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478649>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

ELOY, L. J.; LUCHEIS, S. B. Hemoculture and Polymerase Chain Reaction Using Primers TCZ1/TCZ2 for the Diagnosis of Canine and Feline Trypanosomiasis. **ISRN veterinary science**, Suwov, v. 2012, p. 419378, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3658593&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

FERNANDES, C. D. et al. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 27–32, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19274372>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: A unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 36, n. 3, p. 734–747, 2012.

FERNANDES, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **The Journal of experimental medicine**, Tokyo, v. 208, n. 5, p. 909–21, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3092353&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

FERNANDES, O. et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 58, n. 6, p. 807–11, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660469>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

FREITAS, J. M. et al. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **International journal for parasitology**, New York, v. 35, n. 4, p. 411–7, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777917>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

FREITAS, V. L. T. DE et al. Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4 level. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 5, n. 8, p. e1277, 2011. Public Library of Science. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001277>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

FUNASAKA, T.; RAZ, A.; NANGIA-MAKKER, P. Nuclear transport of galectin-3 and its therapeutic implications. **Seminars in cancer biology**, Philadelphia, v. 27, p. 30–8, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4108496&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

GABEL, M. et al. Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. **The Journal of cell biology**, New York, v. 210, n. 5, p. 785–800, 2015. Disponível em:

<<http://jcb.rupress.org/content/210/5/785.abstract>>. Acesso em: 13 nov. 2015.

GARCIA-SILVA, M. R. et al. Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves. **BioMed research international**, New York, v. 2014, p. 305239, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4000953&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta tropica**, Basel, v. 115, n. 1-2, p. 22–7, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X09001995>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

GERKE, V.; CREUTZ, C. E.; MOSS, S. E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. **Nature reviews. Molecular cell biology**, London, v. 6, n. 6, p. 449–61, 2005. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm1661>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

GLOVER, L.; BROWN, R. H. Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. **Traffic**, Copenhagen, v. 8, n. 7, p. 785–94, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17547707>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

GRASSMÉ, H.; RIETHMÜLLER, J.; GULBINS, E. Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. **Progress in Lipid Research**, Oxford, 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**, Oxford, v. 2012, p. 852430, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3296266&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 nov. 2015.

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. *Trypanosoma cruzi* I diversity: towards the need of genetic subdivision? **Acta tropica**, Basel, v. 119, n. 1, p. 1–4, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21510916>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

GULBINS, E.; KOLESNICK, R. Raft ceramide in molecular medicine. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, n. 45, p. 7070–7077, 2003a.

GULBINS, E.; KOLESNICK, R. Raft ceramide in molecular medicine. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, n. 45, p. 7070–7, 2003b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557812>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

HAN, R. et al. Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury. **The Journal of clinical investigation**, New York, v. 117, n. 7, p. 1805–13, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1904311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

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**, Baltimore, v. 279, n. 14, p. 14157–14164, 2004. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1351152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 6 jan. 2016.

HENAO-MARTÍNEZ, A. F. et al. Murine heart gene expression during acute Chagasic myocarditis. **Genomics Data**, California, v. 4, n. 5, p. 76–77, 2015. Elsevier B.V. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213596015000264>>. .

HERNÁNDEZ-OSORIO, L. A. et al. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. **Journal of biomedicine & biotechnology**, Cairo, v. 2010, p. 283842, 2010. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2796335&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

HOLOPAINEN, J. M.; ANGELOVA, M. I.; KINNUNEN, P. K. Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. **Biophysical journal**, New York, v. 78, n. 2, p. 830–8, 2000. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1300685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 dez. 2015.

HOUZELSTEIN, D. et al. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. **Molecular biology and evolution**, Chicago, v. 21, n. 7, p. 1177–87, 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963092>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

HUDSON, L.; SNARY, D.; MORGAN, S. J. *Trypanosoma cruzi*: continuous cultivation with murine cell lines. **Parasitology**, Lawrence, v. 88 (Pt 2), p. 283–94, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6371672>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

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**, New York, v. 159, n. 4, p. 625–35, 2002. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2173094&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 jan. 2015.

KIM, H. C.; HEALEY, J. M. Effects of pine bark extract administered to immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. **The American journal of Chinese medicine**, Garden city, v. 29, n. 3-4, p. 469–75, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11789589>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

KLESHCHENKO, Y. Y. et al. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi*

adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. **Infection and immunity**, Washington, v. 72, n. 11, p. 6717–21, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=523038&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitology today (Personal ed.)**, Cambridge, v. 16, n. 9, p. 381–7, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951597>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

KOVAL, M.; PAGANO, R. E. Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1082, n. 2, p. 113–25, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2007175>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

LATTES, R.; LASALA, M. B. Chagas disease in the immunosuppressed patient. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 300–9, 2014. Elsevier. Disponível em: <<http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X14602755/fulltext>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

LAURITZEN, S. P.; BOYE, T. L.; NYLANDSTED, J. Annexins are instrumental for efficient plasma membrane repair in cancer cells. **Seminars in cell & developmental biology**, London, v. 45, p. 32–8, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26498035>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

LAW, A.-L. et al. Annexin A2 Regulates Phagocytosis of Photoreceptor Outer Segments in the Mouse Retina. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 20, n. 17, p. 3896–3904, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2735488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 6 jan. 2016.

LENNON, N. J. et al. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 50, p. 50466–73, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506282>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

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>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402–8, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

LUQUETTI, A. O. et al. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins

of *Trypanosoma cruzi*. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v. 46, n. 4, p. 265–71, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12944018>>. Acesso em: 23 dez. 2015.

MACHADO, F. C. et al. Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. **Glycobiology**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 179–84, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24225883>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

MACHADO, F. S. et al. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, Tokio, v. 102, n. 24, p. 3003–8, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113053>>. Acesso em: 5 dez. 2016.

MAEDA, F. Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Frontiers in immunology**, Amsterdam, v. 3, p. 361, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3515895&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

MARTINELLI, P. M. et al. Cardiac NGF and GDNF expression during *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, New York, v. 130, n. 1-2, p. 32–40, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16854632>>. Acesso em: 5 dez. 2016.

MARTINS, R. M. et al. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 13, n. 7, p. 943–54, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21501360>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

MARTINS-MELO, F. R. et al. 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**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 943–57, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24815954>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, Oxford, v. 17, n. 9, p. 1066–75, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22809055>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

MATSUDA, C. et al. Dysferlinopathy Fibroblasts Are Defective in Plasma Membrane Repair. **PLoS currents**, San Francisco, v. 7, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4639325&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

MAYA, J. D. 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**, Oxford, v. 146, n. 4, p. 601–20, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16626984>>. Acesso em: 1 dez. 2015.

MCNEIL, P. L.; KIRCHHAUSEN, T. An emergency response team for membrane repair. **Nature reviews. Molecular cell biology**, London, v. 6, n. 6, p. 499–505, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15928713>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

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**, Berlin, v. 264, n. 2, p. 569–76, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491105>>. Acesso em: 5 dez. 2016.

MICHALSKY, É. M. et al. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 255–259, 2002. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652002000500004&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 3 abr. 2016.

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**, Amsterdam, v. 470, n. 3, p. 305–8, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10745086>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

MOREL, E.; GRUENBERG, J. Annexin A2 Binding to Endosomes and Functions in Endosomal Transport Are Regulated by Tyrosine 23 Phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 3, p. 1604–1611, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18990701>>. Acesso em: 6 jan. 2016.

MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, Wiesbaden, v. 27, n. 7, p. 1477–82, 1989. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=267598&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 jan. 2016.

MOTT, A. et al. Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. **Journal of cellular physiology**, Philadelphia, v. 218, n. 2, p. 315–22, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2592505&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

NOGUEIRA, P. M. et al. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of Extracellular Vesicles**, Järfälla, 26. Nov. 2015. Disponível em: <http://www.journalofextracellularvesicles.net/index.php/jev/article/view/28734/xml_39>. Acesso em: 18 dez. 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, Amsterdam, v. 1820, n. 9, p. 1383–1390, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155450>\n<<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.11.014>>. .

NUNES, M. C. P. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 62, n. 9, p. 767–76, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770163>>. Acesso em: 2 dez. 2015.

PAIVA CAVALCANTI, M. DE et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and cellular probes**, London, v. 27, n. 3-4, p. 122–8, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23402826>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

PARIS, L. et al. [Chagas disease in chronic phase outside the endemic area. The diagnostic tools]. **Bulletin de la Société de pathologie exotique (1990)**, Paris, v. 102, n. 5, p. 319–25, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20131426>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

PAVÍA, P. X. et al. Using S35-S36 and TcH2AF-R primer-based PCR tests to follow-up a Chagas´ disease patient who had undergone a heart transplant. **Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud**, Bogotá, v. 31, n. 2, p. 178–84, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159533>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

PAVIA, P. X. et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone H2A/SIRE and the sno-RNA-C11 genes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 23–30. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384816>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

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**, Botucatu, v. 19, n. 1, p. 34, 2013. CEVAP. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992013000100206&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 28 dez. 2015.

PETERS, I. R. et al. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v. 286, n. 1-2, p. 203–17, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087233>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

PINAZO, M.-J. et al. Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e1965, 2013. Public Library of Science. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001965>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

PINEDA, M. A. et al. Lack of Galectin-3 Prevents Cardiac Fibrosis and Effective

Immune Responses in a Murine Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 212, n. 7, p. 1160–71, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25805753>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

PIRON, M. et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta tropica**, Basel, v. 103, n. 3, p. 195–200, 2007a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17662227>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

PIRON, M. et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta tropica**, Basel, v. 103, n. 3, p. 195–200, 2007b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X07001568>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

PITA-PEREIRA, D. et al. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. **Parasites & vectors**, London, v. 5, p. 15, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240199>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

PRETO, E. et al. Effect of mild aerobic training on the myocardium of mice with chronic Chagas disease. **Biologics : targets & therapy**, Macclesfield, v. 9, p. 87–92, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4590415&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 jan. 2016.

QVARNSTROM, Y. et al. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 6, n. 7, p. e1689, 2012. Public Library of Science. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001689>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

RASSI, A. et al. Protective effect of benznidazole against parasite reactivation in patients chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with corticoids for associated diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 32, n. 5, p. 475–82, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10881079>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632639>>. Acesso em: 27 set. 2015.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, London, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

REDDY, A.; CALER, E. V.; ANDREWS, N. W. Plasma Membrane Repair Is Mediated

by Ca²⁺-Regulated Exocytosis of Lysosomes. **Cell**, Cambridge, v. 106, n. 2, p. 157–169, 2001. Elsevier. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0092867401004214/fulltext>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

REIGNAULT, L. C. et al. Structures containing galectin-3 are recruited to the parasitophorous vacuole containing *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. **Parasitology research**, Berlin, v. 113, n. 6, p. 2323–33, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24760627>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**, Geneva, n. 975, p. v–xii, 1–100, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23484340>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

RICHMOND, J. Y.; MCKINNEY, R. W. **Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia**. 1st ed. Brasília, 2001.

SABINO, E. C. et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity. **European journal of heart failure**, New York, v. 17, n. 4, p. 416–23, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25678239>>. Acesso em: 18 jan. 2016.

SALOMONSSON, E. et al. Mutational tuning of galectin-3 specificity and biological function. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 285, n. 45, p. 35079–91, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2966122&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

SALOMONSSON, E. et al. Monovalent interactions of galectin-1. **Biochemistry**, Washington, v. 49, n. 44, p. 9518–32, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20873803>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

SANTOS, C. R. DOS 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**, Chester, v. 65, n. Pt 6, p. 641–4, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2688432&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

SARDIELLO, M. et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. **Science**, New York, v. 325, n. 5939, p. 473–7, 2009a. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/325/5939/473>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

SARDIELLO, M. et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. **Science**, New York, v. 325, n. 5939, p. 473–7, 2009b. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/325/5939/473.abstract>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

SARTORI, A. M. C. et al. Exacerbation of HIV viral load simultaneous with asymptomatic reactivation of chronic Chagas' disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 67, n. 5, p. 521–3, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12479555>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

SCHEFFER, L. L. et al. Mechanism of Ca²⁺-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. **Nature communications**, London, v. 5, p. 5646, 2014. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/ncomms/2014/141223/ncomms6646/full/ncomms6646.html>>. Acesso em: 19 nov. 2015.

SCHIJMAN, A. G. et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 5, n. 1, p. e931, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3019106&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 dez. 2015.

SCHMIDT, U.; HULKKONEN, J.; NAUE, J. Detection of a G>C single nucleotide polymorphism within a repetitive DNA sequence by high-resolution DNA melting. **International Journal of Legal Medicine**, Heidelberg, p. 1–4, 2016. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00414-016-1350-3>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.73>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta tropica**, Basel, v. 115, n. 1-2, p. 14–21, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X09003623>>. Acesso em: 21 out. 2015.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 583–8, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492206002601>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

SETTEMBRE, C.; BALLABIO, A. TFEB regulates autophagy: an integrated coordination of cellular degradation and recycling processes. **Autophagy**, Georgetown, v. 7, n. 11, p. 1379–81, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785263>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

SETTEMBRE, C. et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. **Science**, New York, v. 332, n. 6036, p. 1429–33, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3638014&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 mai. 2015.

SHETTY, P. et al. Cell surface interaction of annexin A2 and galectin-3 modulates epidermal growth factor receptor signaling in Her-2 negative breast cancer cells. **Molecular and cellular biochemistry**, The Hague, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26438086>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

SILVA, C. V DA et al. Characterization of a 21kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, Paris, v. 11, n. 5, p. 563–70, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344784>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

SILVA, L.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia clin. biol**, São Paulo, 1953. Disponível em: <https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Sobre+uma+cepa+de+Trypanosoma+cruzi+altamente+virulenta+para+o+camundongo+branco&author=L.+H.+P.+Silva&author=V.+Nussenzweig&publication_year=1953#0>. Acesso em: 19 jan. 2015.

SOUTO, R. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 141–152, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685196027557>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

SOUTO, R. P. et al. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 141–52, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027747>>. Acesso em: 9 jan. 2016.

SOUTO, R. P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 45–52, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8114825>>. Acesso em: 9 jan. 2016.

SOUZA, W. DE. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International review of cytology**, New York, v. 86, p. 197–283, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6368447>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

SOUZA, W. DE. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94 Suppl 1, p. 17–36, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677689>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

SOUZA, W. DE; CARVALHO, T. M. U. DE; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International journal of cell biology**, Oxford, v. 2010, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2926652&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

SPAMPANATO, C. et al. Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. **EMBO molecular medicine**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 691–706,

2013. EMBO Press. Disponível em: <<http://embomolmed.embopress.org/content/5/5/691.abstract>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

STURM, N. R. et al. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 205–214, 1989. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685189900820>>. .

TAM, C. et al. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. **The Journal of cell biology**, New York, v. 189, n. 6, p. 1027–38, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2886342&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 dez. 2015.

TANOWITZ, H. B. et al. Chagas' disease. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 5, n. 4, p. 400–19, 1992. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=358257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 24, n. 3, p. 592–630, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3131057&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29 jan. 2015.

TEIXEIRA, T. L. et al. Revealing Annexin A2 and ARF-6 enrollment during *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigote-host cell interaction. **Parasites & vectors**, London, v. 8, p. 493, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4587755&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 jan. 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**, Oxford, v. 277, n. 11, p. 2403–2408, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20477868>>. Acesso em: 6/1/2016.

TORREÃO, J. A. Detection of myocardial inflammation in Chagas' heart disease by cardiac magnetic resonance. , 12. Mar. 2015. Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5131/tde-20052015-120918/>>. Acesso em: 14 jan. 2016.

TOZ, S. O. et al. A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of Leishmania Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey. (H. Louzir, Ed.) **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e2205, 2013. Public Library of Science. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002205>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

TRAJKOVIC, K. et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. **Science**, New York, v. 319, n. 5867, p. 1244–7, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18309083>>. Acesso em: 4 jan. 2014.

TRESOLDI, A. T. et al. Doença de Chagas congênita: reagudização pela corticoterapia. **Pediatria**, São Paulo, v. 6, n. 4/6, p. 207–10, 1984. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=22979&indexSearch=ID>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

UMEZAWA, E. S. et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 37, n. 5, p. 1554–60, 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

VALLEJO, G. A. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta tropica**, Basel, v. 72, n. 2, p. 203–12, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10206119>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

VAN DER VELDEN, V. H. J. et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. **Leukemia**, New Jersey, v. 17, n. 6, p. 1013–34, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764363>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

VIRREIRA, M. et al. Amniotic fluid is not useful for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 75, n. 6, p. 1082–4, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172370>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

VIRREIRA, M. et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 68, n. 5, p. 574–82, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12812349>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

VIRREIRA, M. et al. Comparison of PCR methods for the diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38 Suppl 2, p. 65–7, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16482818>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

VRAY, B. 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**, Oxford, v. 14, n. 7, p. 647–57, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044384>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

WEIRATHER, J. L. et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species

discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 49, n. 11, p. 3892–904, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22042830>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

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

XANTHOPOULOU, A. et al. **Multiplex HRM analysis as a tool for rapid molecular authentication of nine herbal teas**. Vurrey, 2016.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 87–111, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16532210>>. Acesso em: 21 jan. 2015.

YUN, O. et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médecins Sans Frontières. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 3, n. 7, p. e488, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2700957&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30 jan. 2015.

ZONCU, R. et al. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. **Science**, New York, v. 334, n. 6056, p. 678–83, 2011. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/content/334/6056/678?ijkey=ce0df4f3d3aeec74e2b86963d7eachb63996a2939&keytype2=tf_ipsecsha>. Acesso em: 20 jan. 2015.

ZÚÑIGA, E. et al. Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival. **Infection and immunity**, Washington, v. 69, n. 11, p. 6804–12, 2001. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=100058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 jan. 2016.