

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia

**Avaliação da participação da autofagia de células hospedeiras
durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi***

Thabata Lopes Alberto Duque

Belo Horizonte

2013

THABATA LOPES ALBERTO DUQUE

**Avaliação da participação da autofagia de células hospedeiras
durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular
da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular

Orientadora: Dra. Rossana C N Melo
Co-orientador: Dr. Rubem F S Menna-Barreto

Belo Horizonte
2013

043

Duque, Thabata Lopes Alberto.

Avaliação da participação da autofagia de células hospedeiras durante a infecção experimental por trypanosoma cruzi [manuscrito] / Thabata Lopes Alberto Duque. – 2013.

131 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Rossana C. N. Melo. Co-orientador: Rubem F.S. Menna-Barreto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Tripanossoma cruzi – Teses. 2. Macrófagos – Teses. 3. Miócitos cardíacos. 4. Biologia celular – Teses. I. Melo, Rossana Correa Netto de. II. Menna-Barreto, Rubem F. S. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.3

Thabata Lopes Alberto Duque

Avaliação da participação da autofagia de células hospedeiras durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular

Banca Examinadora:

Dra. Rossana Correa Netto de Melo (Orientadora) – UFJF

Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto (Co-orientador) – IOC-RJ

Dra. Elizabeth Ribeiro da Silva - UFMG

Dra. Annamaria Ravara Vago - UFMG

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2013.

Esta dissertação foi realizada nos Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) e Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) sob a orientação da Dra. Rossana Correa Netto de Melo e do Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto, com o apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

“Todo conhecimento é uma resposta
a uma questão.”
Gaston Bachelard

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo. Pela força para continuar a caminhada e perseverança para não desistir frente aos obstáculos encontrados.

Aos meus pais, Sára e Tarcísio, pelo apoio e compreensão, minha irmã Thais pela companhia, aos meus tios, avós e meus padrastos que também participaram e apoiaram essa vida nômade, assim como demais familiares. Esse trabalho não seria possível sem o carinho e compreensão de vocês.

À minha orientadora, Dra. Rossana Melo, por me acolher, desde a Iniciação Científica. É com muita paixão que hoje trabalho com interação patógeno-célula hospedeira, corpúsculos... Obrigada pelo aprendizado desses anos, grata pela chance e confiança depositada.

Ao meu orientador, meu chefinho, Dr. Rubem Menna-Barreto, pela paciência, dedicação e todo suporte no Mestrado. Muito obrigada pelos ensinamentos e orientações, pela amizade, por acreditar que seria possível a realização desse trabalho. Que continuemos discutindo bastante, criticando e produzindo muito!

Ao Laboratório de Biologia Celular – IOC, chefiado pela Dr. Maria Nazaré Soeiro, pelo abrigo, aprendizado, brincadeiras e pela companhia. À Dra. Solange Lisboa de Castro pelas conversas e dicas na sala. À Patrícia Bernadino, Marcos Meuser e Jéssica Lionel pelos ensinamentos nas culturas e com tripomastigotas. A equipe inteira do laboratório, em especial a turma da sala 70: as demais alunas do chefinho, as “rubetes” - Michelle, Marcelle, Xênia, Aruanna, Ana Helisa e o filhote Gustavo, as mais que queridas agregadas Ana Cristina e Natália, que compartilharam positivismo, estresses e paciência, broncas e trabalhos até altas horas e feriados à base de muita diversão e risadas. Obrigada meninas e biscoitinho!

Ao laboratório de Biologia Celular da UFJF, onde iniciei a vida das pesquisas...

Aos amigos que ali fiz e aconselharam nessa jornada. Ao Dr. Helio Chiarini-Garcia que me acolheu no LABER durante minha temporada em BH, assim como toda a equipe do laboratório.

À minha ex-monitora de Biologia Celular, companhia de laboratório em JF e também no Rio, Livia Teixeira, do Laboratório de Imunofarmacologia (IOC), chefiado pela Dra. Patrícia Bozza. Muito obrigada pelos ensinamentos com os corpúsculos e outras técnicas em momentos cruciais desse projeto. A gente se vê ao longo da jornada acadêmica...

Ao Laboratório de Biologia Estrutural, em especial à equipe da Dra. Helene Barbosa (Sandrinha, Renata Morley, Cíntia). À Plataforma de Microscopia Eletrônica (em especial Sr. Luciano). À Dra. Ana Gisele Ferreira, do Laboratório de Toxinologia; à Dra. Mariana Waghbi, do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática. Ao Vítor Vidal, do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, auxiliando sempre que precisei. Muito grata.

À Banca Examinadora pela disponibilidade e por aceitarem contribuir com esse trabalho.

Às amigas de graduação que permaneceram na minha vida... Laura, Maria, Livia, Natalinha, Raquel e Nubia... Mesmo com a distância impedindo convivência diária, amigas sempre. À minha amiga, Grazielle, que participou muito da minha vidinha em BH e me aturou nesse tempo... À amiga e companhia de graduação e mestrado, Luciana, que me auxiliou muitíssimo em BH - grata eternamente pela acolhida. Aos amigos de Barra Mansa, Rio de Janeiro, Juiz de Fora e aos novos e queridos amigos de BH, que também apoiaram, longe ou perto, esse meu sonho...

Às agências financiadoras deste projeto: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PAPES/Fiocruz, FAPEMIG e FAPERJ.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 Formas evolutivas do *T.cruzi*.
- Figura 1.2. Ciclo evolutivo do *T.cruzi*.
- Figura 1.3. Mecanismos de internalização de tripomastigotas em células hospedeiras.
- Figura 1.4. Autofagossomos por microscopia eletrônica de transmissão.
- Figura 1.5. Tipos de autofagia em mamíferos.
- Figura 1.6. Etapas da macroautofagia.
- Figura 1.7. A autofagia na infecção por *T. cruzi*.
- Figura 3.1. Desenho experimental para indução de autofagia.
- Figura 4.1. Avaliação da indução de autofagia pré-infecção por *Trypanosoma cruzi* em macrófagos peritoneais.
- Figura 4.2. Avaliação da indução de autofagia pré-infecção por *T. cruzi* em células cardíacas.
- Figura 4.3. Avaliação da indução de autofagia pós-infecção por *Trypanosoma cruzi* em macrófagos peritoneais.
- Figura 4.4. Avaliação da indução de autofagia pós-infecção por *Trypanosoma cruzi* em células cardíacas.
- Figura 4.5. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais 6h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.
- Figura 4.6. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-tratados com rapamicina, 6h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.
- Figura 4.7. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-tratados com rapamicina, 6h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.
- Figura 4.8. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-tratados com rapamicina, 6h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.
- Figura 4.9. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-incubados em DMEM^{-/-}, 6h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.
- Figura 4.10. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-incubados em DMEM^{-/-}, 6h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.11. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.12. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-tratados com rapamicina, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.13. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-incubados em DMEM^{-/-}, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.14. Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.15. Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-tratadas com rapamicina, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.16. Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-tratadas com rapamicina, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.17. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-incubadas em DMEM^{-/-}, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.18. Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-incubadas em DMEM^{-/-}, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.19. Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas 48h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.20. Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-tratadas com rapamicina, 48h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.21. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-tratadas com rapamicina, 48h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.22. Microscopia eletrônica de transmissão de células células cardíacas pré-incubadas em DMEM^{-/-}, 48h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.23. Análise do número de CLs após a indução de autofagia pré-infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4.24. Análise por imunofluorescência da localização da proteína LC3 após a indução de autofagia pós-infecção por *Trypanosoma cruzi* em macrófagos.

Figura 4.25. . Análise por imunofluorescência da localização da proteína LC3 após a indução de autofagia pós-infecção por *Trypanosoma cruzi* em células cardíacas.

Figura 4.26. Imunomarcação de LC3 por microscopia eletrônica de transmissão em células cardíacas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADRP: proteína relacionada a diferenciação de adipócito
AMC: autofagia mediada por chaperona
AMP: monofosfato de adenosina
AMPK: AMP quinase
ATG: *AuTophagy related genes* (gene relacionado a autofagia)
ATP: trifosfato de adenosina
BSA: albumina sérica bovina
Bz: benznidazol
CHO: ovário de hamster chinês
CL: corpúsculo lipídico
DABCO: meio de montagem octano do diazabicyclo 1.4 [2.2.2]
DAPI: 4',6'-diamidino-2-fenilindol
DMEM: meio Eagle modificado por Dulbecco
DMEM^{-/-}: meio DMEM sem glicose e não suplementado com SFB e L-glutamina
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucléico
EEA1: antígeno de endossomo inicial 1
FIP200: *RB1-inducible coiled-coil protein 1*
GABARAP: proteína associada ao receptor do ácido gama-aminobutírico
GM-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
HIV: vírus da imunodeficiência humana
HMC: *heart muscle cells*
IFN- γ : interferon-gama
IL: interleucina
JNK: Janus quinase
Lamp: proteína associada a membrana lisossomal
LC3: proteína associada ao microtúbulo 1 de cadeia pesada 3
MDC: monodansilcadaverina
MET: microscopia eletrônica de transmissão
MTT: método do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NO: óxido nítrico
NGS: soro normal de carneiro
OMS: Organização Mundial da Saúde
PAHO: Organização Pan Americana de Saúde
PAS: estrutura pré-autofagossomal
PBS: tampão fosfato salino
PCR: reação de cadeia da polimerase
PE: fosfatidiletanolamina
PGE₂: prostaglandina E2
PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase
PI3P: fosfatidilinositol-3-fosfato
PRR: receptores de superfície associados ao reconhecimento de patógenos
RNA: ácido ribonucleico
SFB: soro fetal bovino
SQSTM1: sequestrossomo 1
TGF- β : fator de transformação do crescimento beta
TLR: receptores do tipo *toll*

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TOR: proteína alvo da rapamicina

ULK: quinase tipo Unc

UVRAG: proteína associada à resistência a radiação ultravioleta

VP: vacúolo parasitóforo

Vps34p: proteína de endereçamento vacuolar

WIPI-1: proteína de domínio de repetição WD de interação ao fosfatidilinositol

Resumo

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e representa um sério problema de saúde na América Latina, sendo considerada uma doença negligenciada cujo tratamento atual é insatisfatório e limitado. A sua principal causa de morbidade é a cardiomiopatia, caracterizada por danos nas células cardíacas e presença de infiltrados inflamatórios e fibrose. A interação parasito-célula hospedeira e o consequente estabelecimento da infecção dependem da fusão do vacúolo parasitóforo (VP) com o lisossomo, organela relacionada à endocitose e autofagia. A via autofágica consiste em um importante processo de degradação de macromoléculas e organelas, tendo sido recentemente associada à infecção pelo *T. cruzi*. No entanto, a participação efetiva da autofagia, assim como seu papel na infecção, não são conhecidas. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a participação da autofagia durante a infecção de macrófagos e células cardíacas (HMC) por *T. cruzi*. A pré-incubação com indutor farmacológico de autofagia (rapamicina) ou com meio de estresse nutricional (DMEM^{-/-}) reduziu a infecção e a taxa endocítica em ambas as células, enquanto que a incubação posterior à infecção foi capaz de diminuir a proliferação do parasito apenas em HMC. A análise ultraestrutural apontou características autofágicas típicas como a predominância de autofagossomos e perfis de membrana concêntrica em células estimuladas pré-infecção, além da associação do VP ao autofagossomo, sugestivo de xenofagia. A imunomarcagem para a proteína de autofagia LC3 foi mais abundante em células incubadas com os indutores de autofagia, variando a associação ao parasito nos diferentes tipos celulares e tempos. A imunolocalização por microscopia eletrônica revelou um aumento na expressão desta proteína após a infecção, localizadas no interior de autofagossomos. A análise da interrelação da via autofágica com a biogênese de corpúsculos lipídicos (importantes mediadores inflamatórios durante a infecção) indicou inibição da formação destas organelas em macrófagos, enquanto em HMC não ocorreu alteração do número. Os dados do presente trabalho identificam a autofagia como um processo importante que ocorre em resposta à infecção por *T. cruzi* e que parece atuar na resistência do hospedeiro, controlando a infecção em macrófagos e células cardíacas.

Palavras-chave: Autofagia; *Trypanosoma cruzi*; macrófagos; cardiomiócitos

Abstract

Chagas' disease is caused by the intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. It remains a serious public health problem in Latin America, and the current treatment is not satisfactory. The disease morbidity is associated with cardiomyopathy, characterized by tissue damage, inflammatory infiltrates and fibrosis. Parasite internalization and its subsequent success in infection depend on the fusion of the parasitophorous vacuole (PV) to the lysosome, an important organelle related to endocytosis and autophagy. The autophagic pathway is the process involved in degradation of macromolecules and organelles. This pathway was recently associated with *T. cruzi* infection, but its effective participation as well as its functional role during the infection remain to be defined. Thus, this work aimed to evaluate the occurrence and role of autophagy of macrophages and heart muscle cells (HMC) during the *T. cruzi* infection. Pre-incubation with autophagic inducers (rapamycin and starvation medium – DMEM^{-/-}) reduced infection and endocytic index in both cells, while incubation after infection decreased the parasite replication only in HMC. Ultrastructural analyses of cells previously stimulated with rapamycin and DMEM^{-/-} revealed typical autophagic features such as autophagosomes and concentric membranes. PV- autophagosomes association, suggestive of xenophagy, was also observed. Time- and cell-dependent increase in the autophagic protein LC3 was detected by immunofluorescence after autophagic induction. Immunogold electron microscopy showed an increase in this protein expression after infection within autophagosomes. The cross-talk between autophagic pathway and lipid body biogenesis (important inflammatory organelles during infection) indicated a cell-dependent modulation. In conclusion, autophagy was characterized as an important process in response to the *T. cruzi* infection and seems to participate in the host resistance acting in the control of the infection in macrophages and cardiac cells.

Key words : Autophagy; *Trypanosoma cruzi*; macrophages; cardiomyocytes

Sumário

Lista de figuras	
Lista de abreviaturas	IX
Resumo	XII
Abstract	XV
	XVI
1. Introdução	
1.1. Doença de Chagas	1
1.1.1. Transmissão, epidemiologia e profilaxia	2
1.1.2. Diagnóstico e tratamento	4
1.2. <i>T. cruzi</i> e seu ciclo de vida	5
1.2.1. Interação parasito-célula hospedeira	6
1.3. Autofagia	9
1.3.1. Tipos de Autofagia	12
1.3.1.1. Macroautofagia	13
1.3.1.2. Microautofagia	14
1.3.1.3. Autofagia mediada por chaperona (AMC)	17
1.3.2. Autofagia em mamíferos	18
1.3.3. Autofagia em protozoários	18
1.3.4. Xenofagia	19
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	24
3. Material e métodos	24
3.1. Parasitos	25
3.2. Cultura de células	26
3.3. Indução de autofagia	26
3.3.1. Imunofluorescência	26
3.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão	29
3.3.2.1. MET convencional	29

3.3.2.2. Imunomarcacão ultraestrutural	
3.3.3. Avaliacão da presença de corpúsculos lipídicos (CLs)	30
3.4. Análise estatística	31
3.5. Aspectos éticos	32
4. Resultados	32
4.1. Análise de citotoxicidade	33
4.2. Avaliacão do efeito da indução de autofagia na infecção e proliferaçao intracelular do <i>T. cruzi</i>	34
4.3. Análise ultraestrutural do efeito da indução de autofagia em macrófagos e células cardíacas infectadas por <i>T. cruzi</i>	34
4.4. Análise quantitativa de CLs após a indução de autofagia em macrófagos e células cardíacas infectadas por <i>T. cruzi</i>	40
4.5. Análise da expressao e localizaçao da proteína LC3 após a indução de autofagia em macrófagos e células cardíacas infectadas por <i>T. cruzi</i>	60
5. Discussão	62
6. Conclusões	67
7. Referências Bibliográficas	77
8. Anexo	79
	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma patologia causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, descoberta em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas. A partir de inúmeras observações, Chagas descreveu o ciclo de vida do parasito, as vias de transmissão, manifestações clínicas e o primeiro caso da doença no Brasil (Chagas, 1909).

Esta patologia é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 13 maiores doenças tropicais negligenciadas. De acordo com o levantamento feito pela Organização Pan Americana de Saúde (PAHO) estima-se que, apenas na região latino-americana, a doença acomete 8 milhões de pessoas e milhares de casos surgem anualmente, tendo mais de 100 milhões de indivíduos em área de risco (OMS, 2010; DNDi, 2011). Na América Latina, região endêmica, estudos paleontológicos demonstraram evidências da tripanossomíase americana há mais de 9.000 anos, sugerindo que o surgimento desta zoonose em humanos está associado ao sedentarismo, hábitos de agricultura e domesticação de animais, pois antes a doença era limitada a animais silvestres (Aufderheide et al., 2004; revisto em Ferreira et al., 2011).

A doença de Chagas pode ser dividida em duas fases: aguda e crônica, sendo que a primeira compreende o período inicial pós-infecção, que pode variar de 4 a 8 semanas. Geralmente essa fase é assintomática devido à baixa carga parasitária, apresentando acessos febris. Em alguns casos, a febre pode ser prolongada, ocorrendo hepatoesplenomegalia ou, no caso de transmissão vetorial, o primeiro sinal da infecção pode ser a lesão provocada na pele denominada chagoma de inoculação, que quando acomete a mucosa ocular é chamado de sinal de Romana (revisto em Rassi Jr et al., 2010). Após alcançar a circulação, o parasito invade as células e proliferam intensamente. A proliferação do parasito na fase aguda pode provocar um espessamento microvascular, alterações cardíacas como fibrose e também nos nervos entéricos (revisto em Nagajyothi et al., 2012). No entanto, 60 a 70% dos indivíduos infectados não desenvolvem manifestações clínicas da doença na fase aguda, evoluindo para a fase indeterminada, definida pela sorologia positiva para anticorpos contra o parasito e eletrocardiogramas normais.

A maioria dos pacientes evolui para fase crônica indeterminada assintomática onde permanecem pelo resto das suas vidas. Entretanto, cerca de 25% dos pacientes evoluem para a fase crônica caracterizada essencialmente por cardiomiopatia, comprometimentos gastrointestinais ou ambos. A maior incidência da forma clínica digestiva encontra-se na Argentina, Brasil, Chile e Bolívia, provavelmente associada à população residente na área. Apresenta como sintomatologia o megacólon e megaesôfago, que leva a alterações na motilidade e absorção gastrointestinal. Um pequeno grupo de pacientes pode ainda apresentar complicações neurológicas, como meningoencefalite e lesões periféricas (revisto em Rassi et al., 2010).

Em 2008, a OMS estimou mais de 10.000 mortes decorrentes de complicações envolvendo a tripanossomíase americana (OMS, 2010). A cardiomiopatia associada à infecção é considerada a principal causa de morbidade entre os pacientes da doença de Chagas, sendo a forma clínica cardíaca a mais comum observada na fase crônica. Os pacientes apresentam arritmias e aneurismas apicais, tromboembolismo e outras falhas que comprometem o batimento cardíaco (revisto em Rassi et al., 2012). A histopatologia de pacientes com cardiomegalia mostrou uma hipertrofia e fibrose do miocárdio, além da destruição do tecido conjuntivo. Essas alterações observadas refletem em anormalidades eletrocardiográficas, muitas vezes normalizadas apenas com o uso de marca-passo (revisto em Machado et al., 2012).

Comprometimentos incomuns como lesões epiteliais ou evolução da fase indeterminada para crônica, como danos mais severos no coração têm sido observadas em indivíduos imunocomprometidos, como no caso de pacientes HIV-positivos ou transplantados (OMS, 2010; Martins-Melo et al., 2012; revisto em Parker & Sethi, 2011).

Na fase aguda da infecção, diversas células mono e polimorfonucleares são direcionadas ao local onde o parasito se encontra. No tecido cardíaco, monócitos da corrente sanguínea são diferenciados em macrófagos ativados, que iniciam a produção de diversas moléculas para o combate ao protozoário. Estudos *in vitro* e *in vivo*, como uso de camundongos e ratos, demonstram que essas células do sistema imune apresentam uma morfologia e fisiologia diferenciada (revisto em Melo, 2009). Na presença do fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) ou interferon-gama (IFN- γ), a replicação intracelular do parasito diminui (Reed, 1988; Rodrigues et al., 2012). Por outro lado, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-12 (IL-12) e a IL-6 apresentam aumento na expressão, seguido pela menor expressão de citocinas do perfil

M2 (via não clássica) como IL-4 e IL-13 (Abrahamsohn & Coffman, 1996). Adicionalmente, a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), IL-10, fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e prostaglandina E2 (PGE₂) também são conhecidos como mecanismos de resistência à infecção (Rodrigues et al., 2000; Melo et al., 2003).

Outra característica observada em macrófagos infectados é o aumento do número de corpúsculos lipídicos (CL), estruturas ricas em lipídios neutros e proteínas associadas à produção de mediadores inflamatórios, como cicloxigenases, prostaglandinas e leucotrienos (Melo et al., 2003; Melo et al., 2006; D'Ávila et al., 2008a;2008b;2011). Proveniente do retículo endoplasmático, a síntese dos CL está associada às vias de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (Maya-Monteiro et al., 2008) e dentre as suas proteínas descritas destacam-se enzimas de metabolismo lipídico como perilipina, proteína relacionada a diferenciação de adipócito (ADRP), GTPases Rab, chaperonas e caveolinas (revisto em Melo et al., 2011a; Melo & Dvorak, 2012).

1.1.1. Transmissão, epidemiologia e profilaxia

A forma de transmissão da doença mais comum ocorre por insetos da subordem Triatominae, destacando as espécies *Triatoma infestans*, *T. dimidiata* e *Rhodnius prolixus* (revisto em Rassi Jr et al., 2010). Além da via vetorial, há outras formas de transmissão como a transfusão de sangue, o transplante de órgãos, a transmissão congênita, a via oral (contaminação de alimentos com urina e fezes do triatomíneo infectado) ou ainda os acidentes laboratoriais (revisto em Parker & Sethi, 2011). A transmissão vetorial envolve a presença do inseto triatomíneo popularmente conhecido como barbeiro. Com a ação humana sobre o ambiente silvestre, houve uma “domiciliação” desses vetores, tanto que dos 48 triatomíneos identificados no Brasil, 30 se encontram no ambiente domiciliar (revisto em Coura & Viñas, 2010). Somado a isso, muitos animais são reservatórios do parasito, tanto mamíferos domésticos como cães quanto silvestres como marsupiais (revisto em Rassi Jr et al., 2010).

Segundo a OMS, a doença de Chagas é considerada endêmica em 21 países da América Latina. Todavia, a doença não está mais limitada a países tropicais, sendo também encontrada na Europa, Estados Unidos, Austrália e Japão. A globalização e a

contínua emigração de indivíduos das áreas endêmicas são as principais causas desse aumento, sendo as transmissões não-vetoriais, principalmente a transfusão sanguínea a via de transmissão preponderante em áreas não-endêmicas (revisto em Coura & Viñas, 2010). Nos Estados Unidos, não é obrigatória a realização da sorologia para *T. cruzi* nos bancos de sangue, mesmo com o crescente número de pacientes e a imigração de pessoas de países endêmicos da doença (revisto em Bern et al., 2011). Recentemente foi criada na Europa a EuroTravNet, uma rede para controle de doenças infecciosas no continente, que contabilizou em 2009 mais de 13.000 pacientes infectados em nove países (Pérez-Molina et al., 2011; Gautret et al., 2012).

Em 1991, foi criado o Inconsul (Iniciativa do Cone Sul) nos países onde a doença de Chagas é endêmica. A partir desse momento, grande parte dos esforços de profilaxia concentrou-se na eliminação ou controle da população vetorial em áreas urbanas (OMS, 2010; Hashimoto & Schofield, 2012; Sarquis et al., 2012). Outra via de transmissão importante é a oral, comum em surtos da doença em regiões onde há o controle dos triatomíneos. Na Colômbia e Venezuela esses surtos estão associados ao consumo de sucos de goiaba, laranja e tangerina e no Brasil, a cana-de-açúcar, açaí e bacaba (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). No levantamento feito no país entre os anos de 2005 e 2008, dos 445 novos casos de Doença de Chagas, mais de 70% dos pacientes apontaram a via oral como forma de transmissão (Silveira & Dias, 2011). Sugere-se, assim que, além da eliminação do inseto vetor, políticas de profilaxia envolvam esterilização e sorologia do parasito em bancos de sangue, melhor estrutura de moradias e educação sanitária e profilática (revisto em Coura & Dias, 2009).

1.1.2. Diagnóstico e tratamento

Segundo a OMS, para a confirmação da infecção pelo *T. cruzi*, são necessários dois exames sorológicos positivos no paciente. Além da sorologia para o protozoário, a infecção pode ser detectada por testes parasitológicos como hemocultura e reação de cadeia da polimerase (PCR) (OMS, 2010). Uma vez diagnosticado, é recomendado o tratamento com a droga benznidazol (Bz). Dois compostos desenvolvidos nas décadas de 60 e 70 foram utilizados por muitos anos na clínica – o Bz e o nirfutimox. Entretanto, a descontinuidade na produção do segundo na década de 80 no Brasil e, mais recentemente, em El Salvador impede o seu uso no tratamento (DnDi, 2012; Pinto Dias,

comunicação pessoal). O Bz é indicado para todas as fases da patologia e o tratamento pode prevenir a progressão da doença com a diminuição da carga parasitária, entretanto não deve ser utilizado por gestantes (revisto em Coura & Borges-Pereira, 2010; Nagajyothi et al., 2012). Contudo, a busca por novos fármacos mais eficazes prossegue, principalmente devido à eficácia limitada do Bz na fase crônica da doença, que juntamente com os efeitos colaterais diagnosticados no seu uso contínuo como a perda de peso e anorexia, sonolência, alterações dermatológicas e neurológicas, reforça a necessidade de alternativas para o tratamento (revisto em Apt, 2010).

1.2. *T. cruzi* e seu ciclo de vida

Protozoário da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, o *T. cruzi* possui três formas evolutivas: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Este parasito possui diversas organelas comuns às demais células eucarióticas, mas apresenta uma particularidade da ordem: a mitocôndria única e ramificada, com o DNA concentrado em uma das extremidades da organela (cinetoplasto). O DNA de cinetoplasto (kDNA) é constituído por uma rede de DNA composta por milhares de minicírculos e dezenas de maxicírculos interconectados (Shapiro & Englund, 1995). Os maxicírculos são análogos ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores em relação à estrutura e funcionalidade, sendo responsáveis por codificar RNA ribossomal e subunidades dos complexos respiratórios mitocondriais. Os minicírculos codificam RNA que modificam os transcritos dos maxicírculos em um processo chamado edição de RNA (Ávila & Simpson, 1995; Stuart & Panigrahi, 2002). Entretanto, apesar do kDNA representar cerca de 30% do DNA total do parasito, poucas proteínas são sintetizadas na mitocôndria, sendo a maioria importada do citosol (revisto em De Souza et al, 2009). A característica morfológica do cinetoplasto varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do protozoário, sendo em forma de bastão nas formas epimastigotas e amastigotas, e arredondado em tripomastigotas (De Souza, 2002a). Outra característica marcante é a inserção e tamanho do flagelo nas diferentes formas: interiorizado na amastigota, região posterior em tripomastigotas e antero-lateral em epimastigotas (Figura 1.1) (revisto em De Souza, 2002b). Tanto o cinetoplasto como o flagelo são de fundamental importância durante a divisão celular por estarem fisicamente associados à bolsa flagelar, auxiliando no processo de fissão mitocondrial (Gull, 1999).

Além das características já mencionadas, o *T. cruzi* possui organelas peculiares não encontradas em células de mamíferos. Dentre elas, destaca-se o acidocalcissomo, organela ácida, reservatório de pirofosfato e polifosfato além de inúmeros íons como magnésio, zinco, cálcio e sódio. Atuando como fonte energética secundária, os acidocalcissomos também participam do mecanismo de manutenção do pH e osmolaridade celulares (Docampo et al., 2005, 2010; Rohloff & DoCampo, 2008). Os glicossomos são organelas esféricas de matriz densa presentes apenas em organismos tripanosomatídeos. Dentro desta organela, encontram-se as enzimas responsáveis pelas etapas iniciais da via glicolítica, sendo observado em *Trypanosoma brucei* que alterações nos níveis de enzimas glicolíticas ocorrem de acordo com o meio em que o parasito está inserido (Opperdoes & Borst, 1977; revisto em Parsons, 2004; De Souza, 2009a), sendo a glicólise a principal fonte de trifosfato de adenosina (ATP) nas formas sanguíneas de *T. brucei*. Os glicossomos são considerados um tipo específico de peroxissomo que no caso do *T. cruzi* não contém catalase. Essa organela contém enzimas para outros processos importantes como a via das pentoses-fosfato, β -oxidação de ácidos graxos, via de biossíntese de pirimidina, entre outros (Michels et al, 2006). Na região posterior somente das formas epimastigotas, são encontrados os reservossomos, organelas esféricas consideradas pré-lisossomos devido à ausência de marcadores de lisossomais típicos (Soares, 1999).

Em seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta dois hospedeiros: um vertebrado mamífero incluindo o homem; e um invertebrado, o inseto triatomíneo popularmente conhecido como barbeiro. Durante o seu repasto sanguíneo, o triatomíneo ingere formas tripomastigotas que ao alcançar a porção anterior do intestino se diferenciam em epimastigotas, formas replicativas presente no inseto. Após a migração para a porção terminal do intestino do inseto, ocorre uma nova diferenciação, de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese). Essas formas metacíclicas são eliminadas junto à urina e fezes do inseto durante a hematofagia, alcançando a corrente sanguínea do mamífero através da injúria provocada pela picada do inseto ou através de alguma mucosa. Formas tripomastigotas metacíclicas podem infectar qualquer tipo celular no sítio de inoculação como macrófagos e células epiteliais. Após a internalização, os tripomastigotas começam a se diferenciar em amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo (VP) terminando o processo no citoplasma. Os amastigotas proliferam intensamente no ambiente intracelular até que uma nova diferenciação ocorre para tripomastigotas, os

quais rompem a célula e atingem, a corrente sanguínea, o que possibilita a invasão de outras células e tecidos. O ciclo se completa quando um novo triatomíneo se alimenta do sangue do mamífero infectado (Figura 1.2) (revisto em De Souza, 2009).

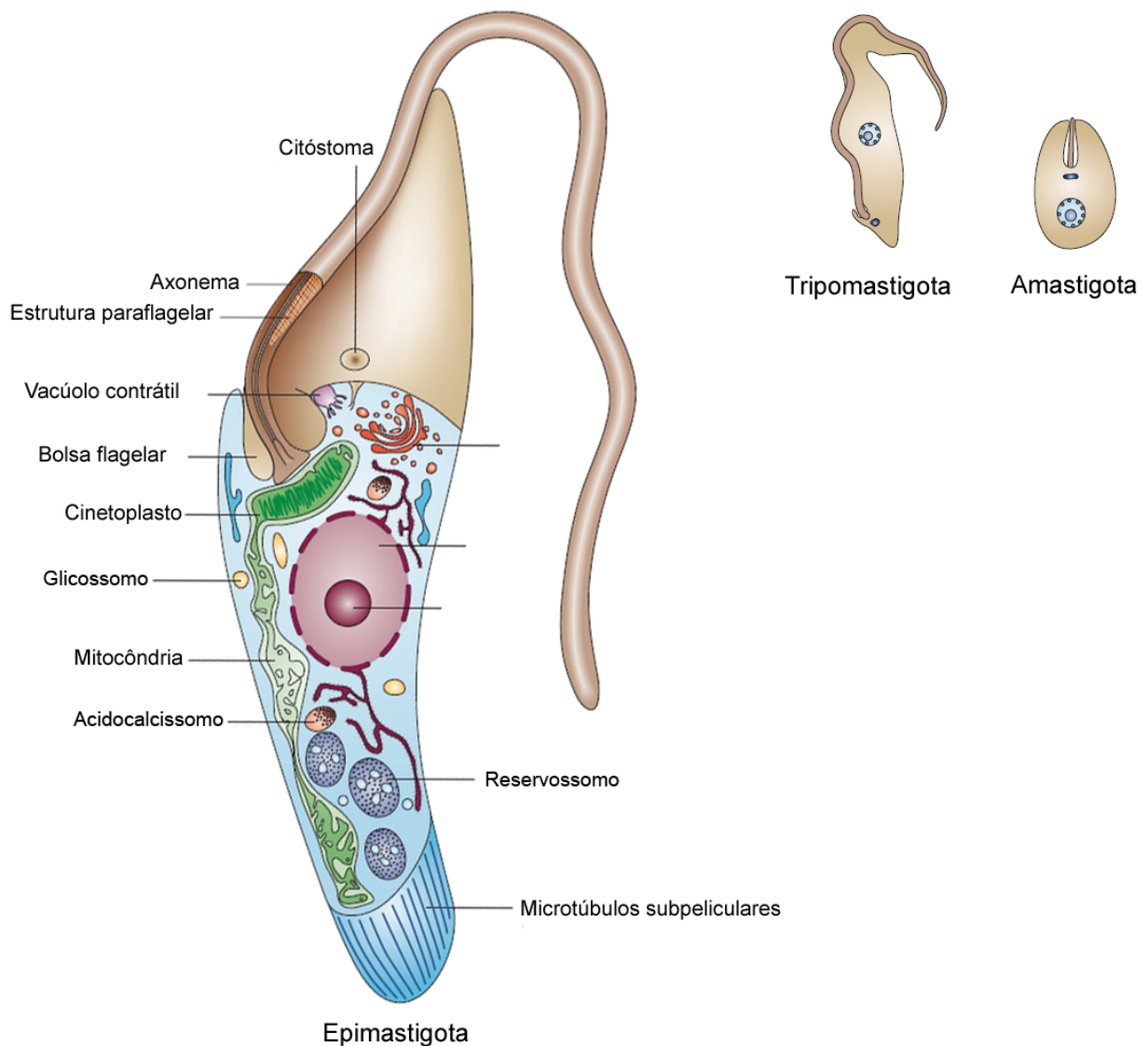


Figura 1.1. Ultraestrutura do *T. cruzi* e suas formas evolutivas.
(Adaptado de DoCampo et al., 2005)

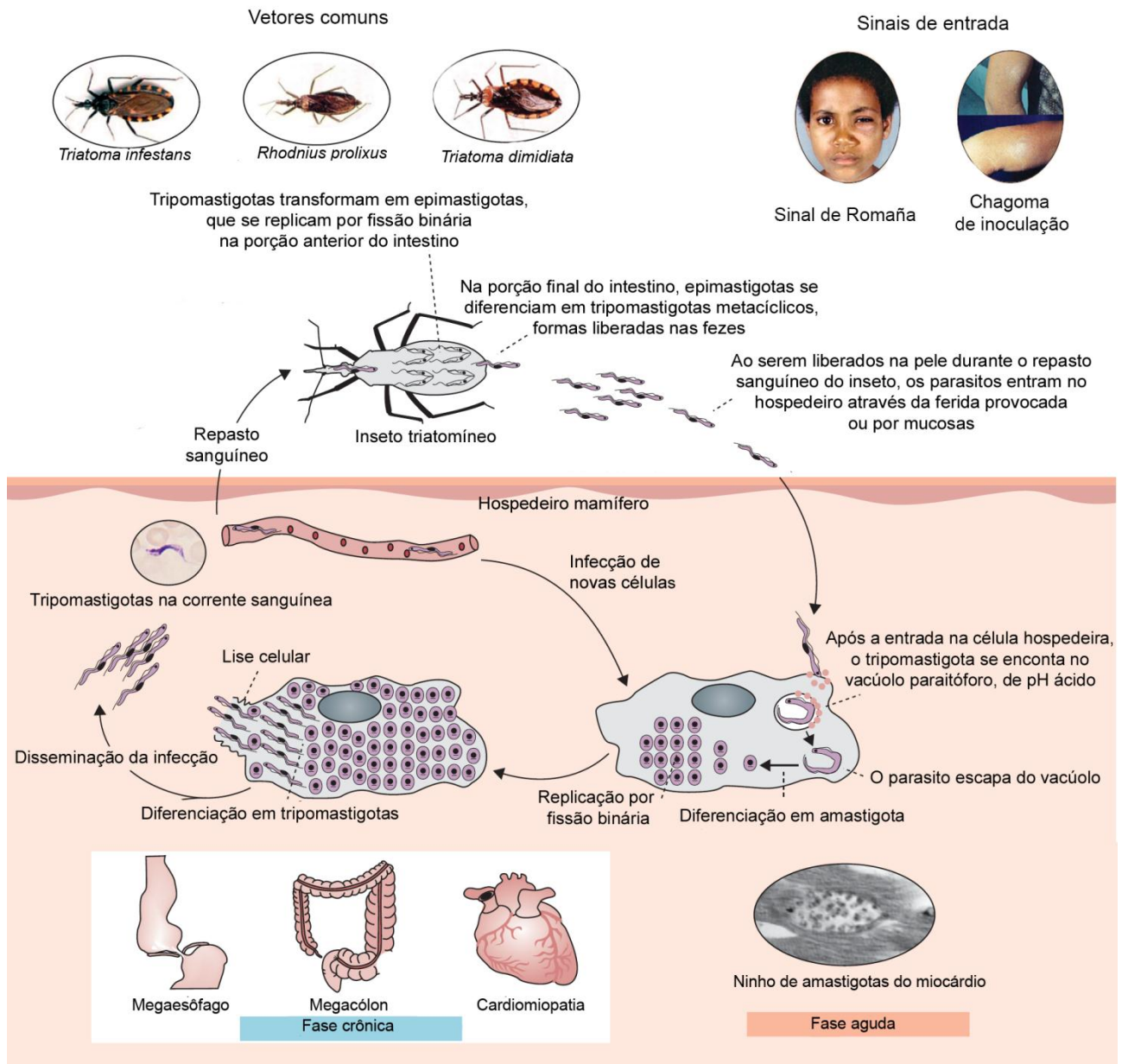


Figura 1.2. Ciclo evolutivo do *T. cruzi* (Adaptado de Rassi et al., 2010).

1.2.1. Interação parasito-célula hospedeira

Diversos fatores podem influenciar o processo de interação do parasito com as células de mamíferos, dentre os quais podemos destacar a cepa, a forma do parasito e o tipo celular. Esse processo se encontra diretamente relacionado à expressão de moléculas envolvidas nas etapas de reconhecimento, adesão, sinalização e internalização do patógeno. Em um primeiro momento, ocorre a adesão do *T. cruzi* na superfície da célula hospedeira através do reconhecimento de moléculas na superfície do protozoário.

Após essa etapa de reconhecimento, uma via de sinalização é disparada na célula hospedeira, culminando na internalização do parasito e na formação do VP contendo o tripomastigota. Após o rompimento da membrana deste vacúolo através da participação de enzimas como a cruzipaina e TcTox, o protozoário é liberado para o citosol onde a diferenciação para amastigotas se completa, dando prosseguimento ao ciclo do parasito (Hall et al., 1992; Steconni-Silva et al., 2003; Rubin-de-Cellis et al., 2006; revisto em De Souza et al., 2010).

Dentre as diversas moléculas que atuam no processo de adesão do parasito, destacam-se as mucinas e transialidases. As mucinas, grupo de glicoproteínas que recobrem a superfície, estão presentes no *T. cruzi* interagindo com resíduos de açúcar da membrana celular do mamífero. As transialidases são responsáveis por transferir ácido siálico da membrana celular do hospedeiro para mucinas do protozoário, impedindo a lise pelo sistema complemento do hospedeiro, necessário para o sucesso da infecção (Schenkman et al., 1993; Yoshida et al., 1997). Já foi descrita a presença das transialidases gp82 e gp85 em tripomastigotas metacíclicos e de cultura, respectivamente, sendo a presença da gp83 demonstrada em ambas as formas infectivas (revisto em Alves & Mortara, 2009). Proteases do parasito como a cruzipaina, oligopeptidase B e a Tc80 também desempenham papel durante interação parasito-mamífero, resultando na liberação de cálcio do retículo endoplasmático do hospedeiro ou na hidrólise de componentes de matriz extracelular (Tardieux et al., 1994; Caler et al., 1998; Rodriguez et al., 1999; Garzoni et al., 2003; Calvet et al., 2004; Melo et al., 2008; revisto em De Souza et al., 2010).

Além da alteração no fluxo de cálcio e adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (Tardieux et al., 1992; Caler et al., 2000), diversas moléculas da membrana plasmática da célula hospedeira estão associadas à etapa de adesão do parasito como glicoconjugados, receptores e domínios lipídicos conforme descritos em células fagocíticas e não-fagocíticas profissionais (Soeiro et al., 1999; Todorov et al., 2003; Barrias et al., 2007; Fernandes et al., 2007; de Melo-Jorge & PereiraPerrin, 2007; Nagajyothi et al., 2011; Hissa et al., 2012). Receptores de citocinas como TGF- β e do tipo *toll-like* também estão envolvidos na sinalização durante a infecção por *T. cruzi* (Waghbi et al., 2005; 2007; Bafica et al., 2006; revisto em Villalta et al., 2009).

O aumento do cálcio citosólico e a sinalização desencadeada pelo parasito na célula hospedeira permitem a invasão do protozoário na célula por um mecanismo ativo

ou passivo. Durante o processo ativo, não há a mobilização do citoesqueleto do hospedeiro, entretanto no passivo, observa-se a participação de filamentos de actina e, tanto na penetração ativa como passiva, a mobilização de lisossomos ao sítio de entrada (Schenkman et al., 1991; Shenkman & Mortara, 1992; Barbosa & Meirelles, 1995; Rodriguez et al., 1999; Andrade & Andrews, 2004; Ferreira et al., 2006; Albertti et al., 2009; Fernandes et al., 2011). A participação dos lisossomos torna-se essencial para o sucesso da infecção, uma vez que o pH do vacúolo parasitóforo deve ser ácido para que o processo de diferenciação para amastigotas se inicie (Ley et al., 1990; revisto em Andrade & Andrews, 2005).

Uma das hipóteses descritas para a fusão lisossomal envolve a liberação das enzimas hidrolíticas desta organela no local onde o parasito se adere e é internalizado (Andrade & Andrews, 2004; Fernandes et al., 2011, Hissa et al., 2012). Outra possibilidade parece ser a fusão do lisossomo com o vacúolo previamente formado contendo o parasito (Woolsey & Burleigh, 2004; revisto em Burleigh, 2005). Independente da fusão inicial ou tardia da organela, os mecanismos envolvidos na invasão parecem depender da participação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (Todorov et al., 2000; Wilkowsky et al., 2001; Woolsey et al., 2003) (Figura 1.3). PI3K são enzimas que fosforilam os fosfatidilinositóis como fosfatidilinositol-4-fosfato ou fosfatidilinositol-4,5-bifosfato. À semelhança do que ocorre com a Vps34p em leveduras, junto à atividade catalítica, também foi identificada a participação de PI3K na regulação do citoesqueleto, captação de glicose e na fusão endossomal (Corvera & Czech, 1998). Desse modo, diversas proteínas presentes em endossomos como a EEA1 e as GTPases Rab mostraram associação com a via de PI3K, inclusive durante a internalização do *T. cruzi* (Wilkowsky et al., 2002; Woolsey et al., 2003; Andrade & Andrews, 2004; Batista et al., 2006).

Apesar de não serem descritas como formas infectivas, amastigotas também podem infectar células, possuindo diferentes moléculas em sua superfície e mecanismos de sinalização, geralmente dependentes de cálcio e PI3K (Fernandes et al., 2006). Vias não-usuais para a internalização e proliferação do *T. cruzi* envolvendo a associação a outras infecções ou a células apoptóticas vem sendo descritas (Freire-de-Lima et al., 2000; Andreoli et al., 2003; D'Ávila et al., 2011). Em linhas gerais, o processo de infecção promove diversas alterações na célula hospedeira, incluindo a modulação da expressão gênica. Genes envolvidos na reorganização do citoesqueleto, interação célula-célula,

apoptose e ciclo celular e, muitos deles associados a mecanismos de estresse, resposta imune e inflamação, u vem sendo relacionados à infecção pelo parasito. Entretanto, suas implicações biológicas ainda requerem mais investigações (Vaena de Avalos et al., 2002; Manque et al., 2011).

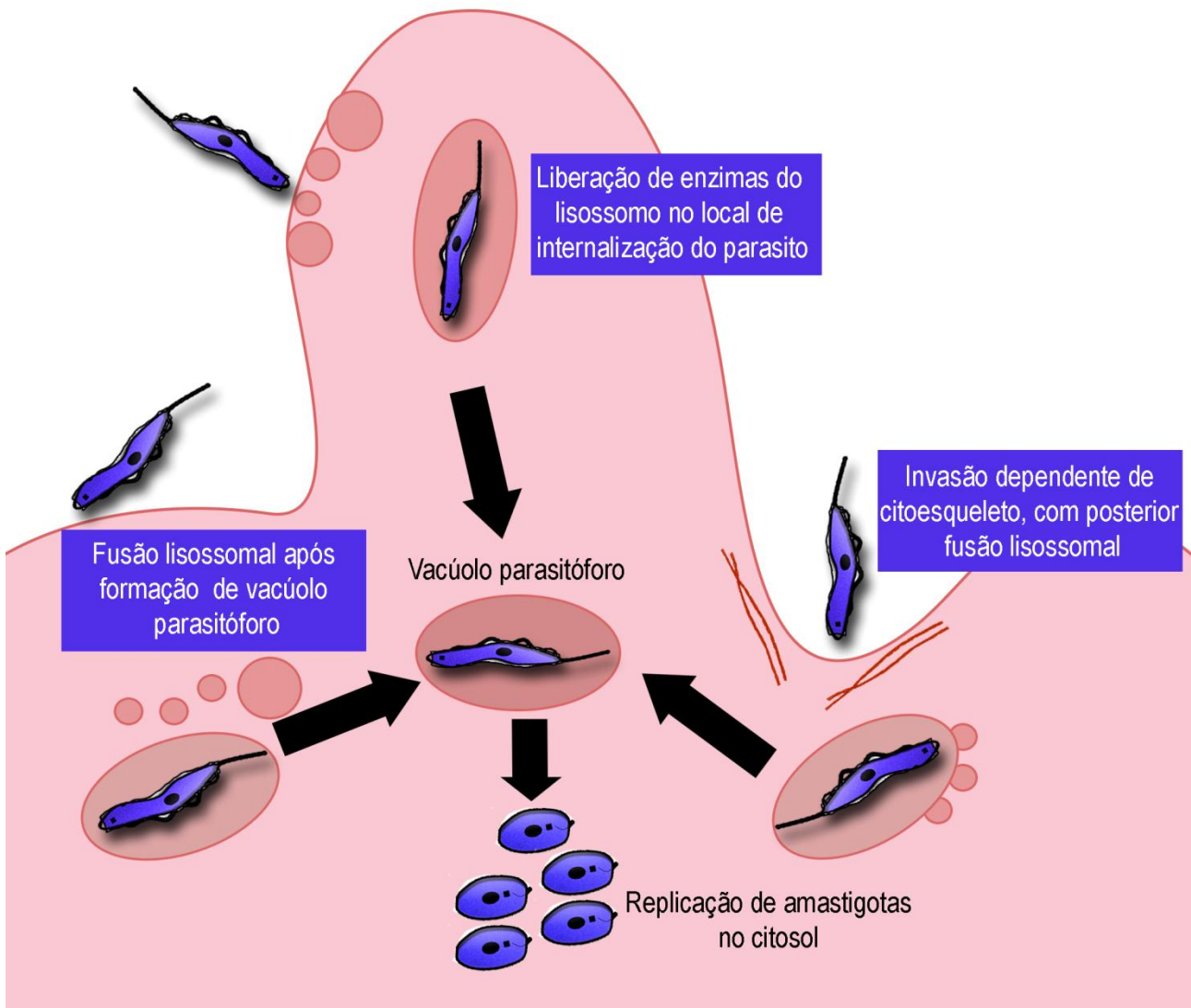


Figura 1.3. Mecanismos de internalização de tripomastigotas nas células hospedeiras.

1.3. Autofagia

Células eucarióticas possuem mecanismos de reciclagem de macromoléculas que envolvem dois sistemas principais: ubiquitina-proteassomo e autofagia-lisossomo. O

primeiro é responsável pela degradação de proteínas citosólicas mediante a conjugação à ubiquitina e seu direcionamento ao complexo multienzimático denominado proteassomo (revisto em Koga et al., 2011). Já a autofagia, consiste no mecanismo de degradação de quaisquer componentes citoplasmáticos através da via lisossomal, de modo seletivo ou não seletivo. Este processo ocorre fisiologicamente durante todo o ciclo celular, mas é exacerbado em condições de estresse como na deprivação nutricional. Por se tratar de uma atividade fisiológica e constitutiva, a via autofágica possibilita adaptações a diferentes condições, permitindo a diferenciação, desenvolvimento e a homeostase celular. Além disso, a autofagia promove em determinados tipos celulares a modulação do ciclo celular, crescimento, apresentação antigênica, produção de citocinas e degradação de patógenos intracelulares (revisto em Münz, 2009). O desequilíbrio dessa via autofágica (aumento ou redução) pode provocar morte celular autofágica (revisto em Kroemer & Levine, 2008).

Em meados da década de 1950, Christian de Duve descreveu os lisossomos e criou em 1963, o termo autofagia. Este foi inicialmente descrito em células de mamíferos após observações por microscopia eletrônica de transmissão de estruturas circundadas por membrana única ou dupla, que armazenavam citoplasma e componentes em diversos estágios de degradação (Figura 1.4) (revisto em Klionsky, 2007).

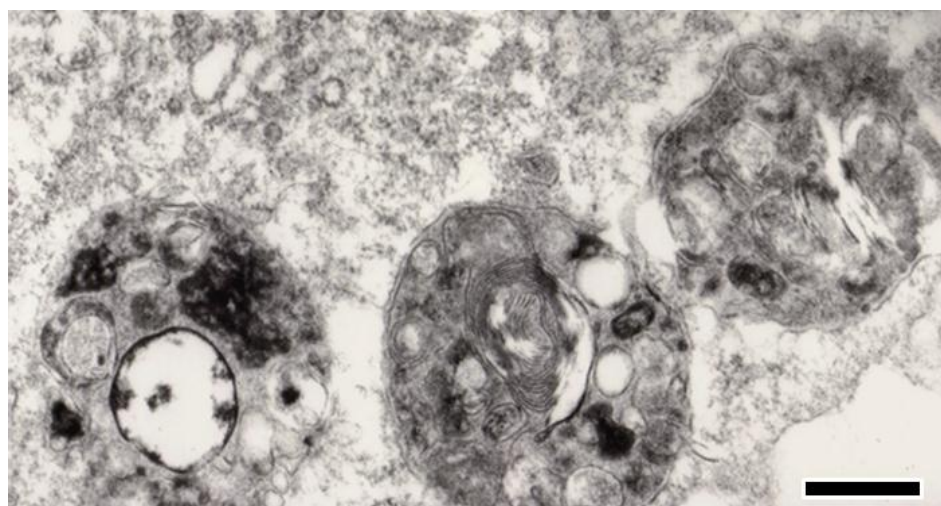


Figura 1.4. Autogossomos por microscopia eletrônica de transmissão. Vacúolos com diferentes graus de degradação com uma ou mais membranas envolvendo conteúdo a ser degradado (Duque, 2010).

Nos anos subsequentes, poucos estudos morfológicos envolvendo este mecanismo de degradação foram realizados. A partir do final da década de 1990, utilizando leveduras como modelo, foram descobertos os primeiros genes associados à autofagia - ATGs (do inglês *AuTophagy related genes*), o que permitiu o avanço dos estudos moleculares e bioquímicos do processo (Mizushima et al., 1998; 2011a). Atualmente, mais de 30 ATGs são conhecidos em *Sacharomyces cerevisiae*, sendo a maioria ortólogos em mamíferos e outros eucariotos (revisto em Xie & Klionsky, 2007).

1.3.1. Tipos de Autofagia

Os tipos mais comuns de autofagia em mamíferos são: a macroautofagia, microautofagia e a autofagia mediada por chaperona (AMC) (Figura 1.5) (revisto em Mizushima et al., 2011b).

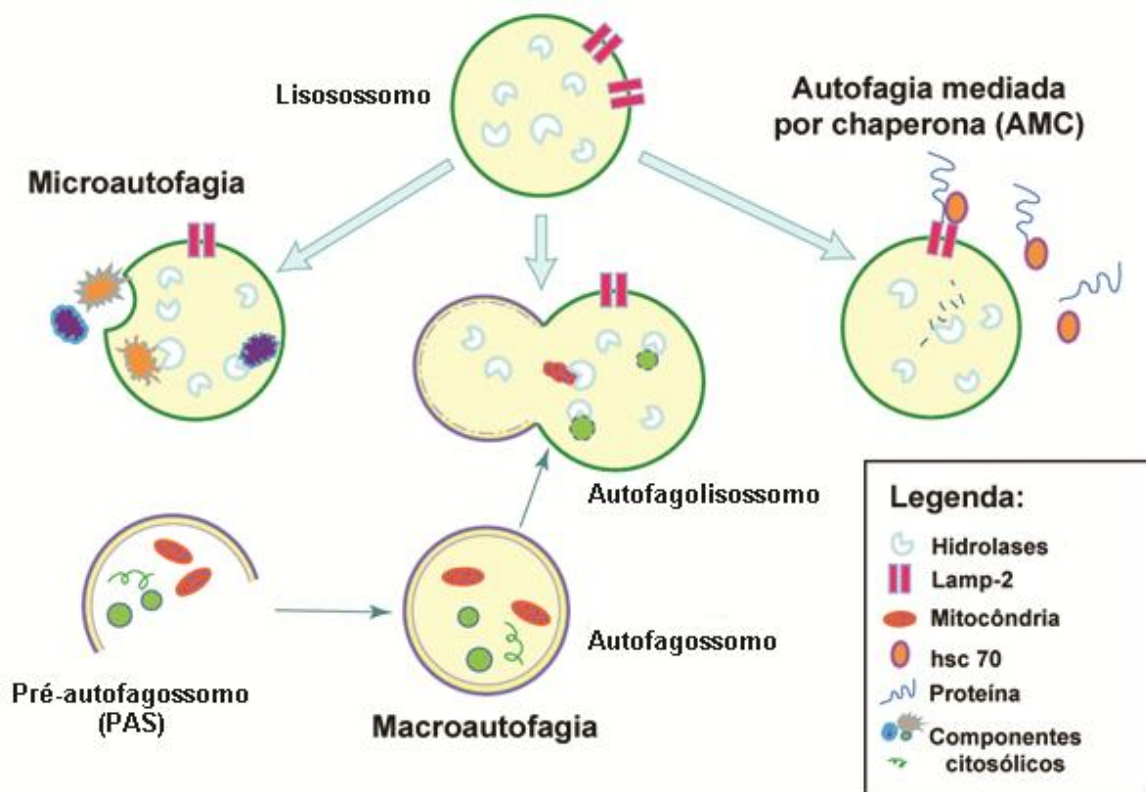


Figura 1.5. Tipos de autofagia (Adaptado de Dong & Czaja, 2011).

1.3.1.1. Macroautofagia

A macroautofagia foi o primeiro tipo descrito em mamíferos e o mais estudado, e consiste no sequestro de macromoléculas e organelas por estruturas denominadas autofagossomos, que circundam o material a ser degradado pelo lisossomo. Este tipo de autofagia pode ser realizado de modo seletivo, mediante a participação de proteínas adaptadoras como a p62, Parkina ou sequestrassomo 1 (SQSTM1) em células de mamíferos, que interagem com proteínas do autofagossomo, como de modo não-seletivo, onde as macromoléculas e/ ou organelas são envoltas pela membrana sem proteínas específicas (revisto em Münz, 2009).

Grande parte das etapas da macroautofagia é dependente das proteínas Atg e suas conjugações. Destacam-se os sistemas: Atg1 quinase/ quinase tipo Unc (ULK) e seus reguladores, PI3K classe III e os complexos envolvendo Atg8 (LC3 em mamíferos) e Atg12. A Figura 1.6 ilustra o mecanismo de formação do autofagossomo.

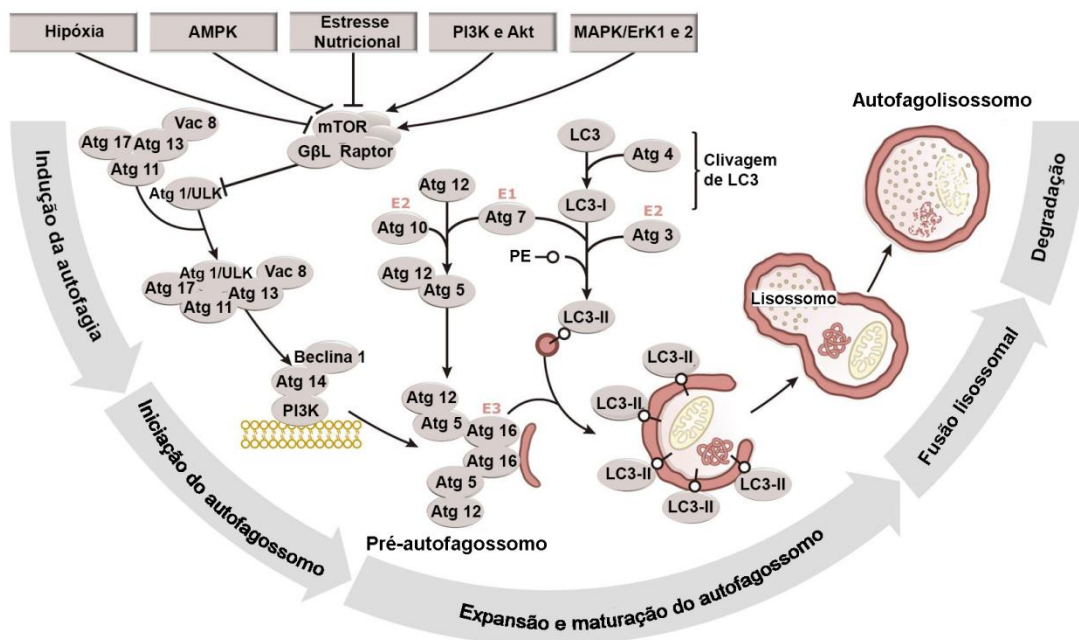


Figura 1.6. Etapas da macroautofagia (Adaptado de GeneTex, 2012).

O mecanismo de indução da macroautofagia depende de condições de estresse, principalmente daqueles que culminam em baixa nutricional, como estresse oxidativo, diferenças de temperatura e déficit de nutrientes. Direciona-se assim a inativação da

proteína sensora de nutrientes – proteína alvo da rapamicina (TOR), referida em mamíferos como mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) (Sengupta et al., 2010). A proteína TOR é uma serina-treonina quinase que além de controlar a resposta ao estresse e a nutrientes, também atua no controle do ciclo celular, fatores de crescimento e de energia como ATP. Dois complexos são descritos: TORC1 e TORC2, sendo que o primeiro apresenta a subunidade FKBP12, que se associa a rapamicina, fármaco inibidor de TORC1, comumente usado como indutor do processo autofágico (Hall, 2008; Mizushima et al., 2011a). A inibição da TOR (através do estresse nutricional ou por efeito da rapamicina) leva a não-fosforilação da Atg quinase ULK1/2 formando o complexo com Atg13, Atg101 e *RB1-inducible coiled-coil protein 1* (FIP200), que é direcionado ao local de iniciação do autofagossomo.

Concomitantemente, ocorre a formação da estrutura pré-autofagossomal (PAS) de maneira PI3K-classe III dependente. Com a participação das Atg14L e beclina-1 no complexo PI3K, há o recrutamento de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) do retículo endoplasmático para a formação da PAS. A presença de PI3P no retículo é uma das evidências que sugerem esta organela como a origem da membrana da PAS, embora outras fontes como a mitocôndria e o Golgi sejam também indicadas (Geng & Klionsky, 2010; Luo et al., 2009). Além do complexo PI3K-classe III, outras proteínas efetoras de PI3P também estão associadas, como é o caso da proteína de domínio de repetição WD de interação ao fosfatidilinositol (WIPI-1 ou Atg18 em leveduras) que se associa a Atg2 iniciando o PI3P na membrana autofagossomal. A Atg9, também presente em endossomos tardios e no Golgi, é inserida no autofagossomo no início da sua formação.

Para a expansão da PAS, dois sistemas tipo ubiquitina estão envolvidos: LC3 (Atg8 em leveduras) conjugado à fosfatidiletanolamina (PE), e Atg5-Atg12. A proteína associada ao microtúbulo 1 de cadeia pesada 3 (LC3 ou MAP1-LC3) e seus homólogos [proteína associada ao receptor do ácido gama-aminobutírico (GABARAP, GABARAPL-1, GABARAPL-2)] são sintetizados como moléculas precursoras. Após serem clivadas por Atg4, e, com a participação de Atg7 e Atg3 ocorre a ligação covalente ao fosfolípido PE. LC3-PE localiza-se tanto na membrana externa como na membrana interna do autofagossomo, representando o marcador de autofagossomos mais difundido, uma vez que está presente durante todo o processo autofágico, incluindo o processo de fusão lisossomal (revisto em Yang & Klionsky, 2010). Assim como a LC3, a Atg12 também está presente no citosol como molécula precursora, cuja ativação é dependente de Atg7 e

Atg10, possibilitando a conjugação a Atg5. O complexo Atg5-Atg12 se liga à Atg16 e ao contrário dos demais complexos, este é constitutivamente formado, sequestrando membrana, independente das condições de nutriente. Em mamíferos, é descrita a presença do conjugado Atg5-Atg12 até o final da PAS, estando ausente a partir do estágio de maturação do autofagossomo. Sua importância *in vivo* está relacionada à facilitação da reação de ativação de LC3 pela Atg3 (Mizushima et al., 2011a).

Diversos complexos proteicos estão envolvidos durante as etapas de maturação do autofagossomo até a fusão lisossomal. Rubicon e a proteína associada à resistência a radiação ultravioleta (UVRAG) são proteínas que se ligam a beclina-1 e regulam o tráfego endocítico e autofagossomal. Quando estão associadas, o complexo regula negativamente a maturação e a dissociação de Rubicon a UVRAG/beclina-1 levando a regulação positiva do processo (revisto em Mehrpour et al., 2010). Outra proteína importante na etapa de maturação é a Rab7. A atividade GTPásica, estimulada pela associação UVRAG/beclina-1, permite a fusão de endossomos tardios (comumente marcados por Rab 7) a autofagossomos (Gutierrez et al., 2004a). Para a fusão lisossomal, a ausência das proteínas de membrana como Lamp-1 e Lamp-2 impede a formação do autofagolisossomo, assim como demonstra a importância do conteúdo lisossomal na degradação de componentes, mediada por ATPases, fosfatases, lipases e principalmente proteases como as catepsinas, calpaínas, caspases e presinilinas (revisto em Luzio et al., 2007).

1.3.1.2. Microautofagia

A microautofagia envolve a degradação de componentes citoplasmáticos como proteínas e organelas usando a própria membrana do lisossomo como membrana de iniciação, também visualizado por microscopia eletrônica de transmissão como corpos multivesiculares. Descrita inicialmente em células de mamíferos, os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estão bem esclarecidos, se conhecendo apenas a participação de algumas GTPases, citoesqueleto e hidrolases lisossomais no processo (revisto em Li et al., 2012; Mijaljica et al., 2011).

1.3.1.3. Autofagia mediada por chaperona (AMC)

Na AMC, proteínas são translocadas para o lúmen dos lisossomos, sem a formação de vesículas intermediárias, através da participação da proteína Lamp-2A (proteína membrana do tipo 2A associada ao lisossomo). Para tanto, tais proteínas-substrato apresentam a sequência sinal KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), que é reconhecida pela chaperona hsc70, direcionando o complexo ao lisossomo, onde se liga a Lamp-2A. Uma multimerização da Lamp-2A ocorre, gerando um poro por onde o substrato será translocado para eliminação (Cuervo, 2004; Orenstein & Cuervo, 2010)

1.3.2. . Autofagia em mamíferos

Em todas as etapas de vida do mamífero, seja na formação e desenvolvimento do embrião, na fase neonata e pós-nascimento, a autofagia desempenha papel crucial. Após o nascimento, quando a nutrição não é mais feita através da placenta, ocorre um severo estresse nutricional, desencadeando o processo autofágico. Camundongos *knockout* para Atgs 3, 5, 7, 9 ou 16L não sobrevivem após o nascimento, devido ao decréscimo de aminoácidos no organismo (Mizushima & Levine, 2010). Durante o desenvolvimento pós-natal, a participação da autofagia mostra-se importante em diversos órgãos como o cérebro, onde a autofagia previne a formação de agregados proteicos e o acúmulo de organelas danificadas, desencadeando doenças neurodegenerativas. Já no fígado, a lipofagia (degradação de CL) é essencial para a gliconeogênese e homeostase tecidual, além de convergir com a via de lipólise (Singh et al., 2009). Em adipócitos, a inibição da via autofágica reduz a formação de triglicerídeos e assim como os níveis de fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação adipogênica (Mizushima et al., 2011a).

No coração, funções importantes são atribuídas ao processo autofágico. Em ratos, quando a via está suprimida, há o acúmulo de mitocôndrias danificadas, além da redução no número de sarcômeros podendo ou não apresentar má formação. Tal fato desencadeia a morte do animal até o sexto mês de vida, sendo observado no animal adulto que a deficiência de Atg5 leva à hipertrofia e disfunção cardíaca (Nakai et al., 2007). Dessa forma, o balanço da autofagia parece ser a chave do funcionamento cardíaco, pois o aumento da expressão de beclina-1 compromete o órgão em situações de pressão arterial

elevada. Na via de isquemia e reperfusão cardíaca (reestabelecimento do fluxo sanguíneo), a autofagia é paradoxal: quando o fluxo sanguíneo diminui, a autofagia é protetora por regular a proteína quinase dependente de AMP (AMPK), controlando os níveis de ATP para manutenção da homeostase; na reperfusão, o aumento de beclina-1 induz à autofagia como mecanismo de morte celular (revisto em Nishida et al., 2009).

No sistema imune, o funcionamento adequado das células é dependente da autofagia, seja na seleção tímica, na apresentação antigênica, no desenvolvimento e maturação linfocitárias (revisto em Münz, 2009). Em células mononucleares, a autofagia tem sido demonstrada na diferenciação de monócitos para macrófagos, prevenindo os monócitos da morte celular. O processo de diferenciação ocorre, pois há a dissociação da beclina-1 de outras proteínas associadas à via apoptótica como as moléculas da família Bcl-2 e da via de sinalização Janus quinase (JNK). Além disso, foi demonstrado que a GM-CSF bloqueia a atividade de calpaínas, que impedem a ligação de proteínas truncadas a Atg5 (Zhang et al., 2012). Outro indicativo de conversão de vias está relacionado à produção de espécies reativas pelo macrófago, que induz o processo autofágico caracterizado morfologicamente por membranas circundando estruturas citosólicas e a imunolocalização de proteínas autofágicas (Perrotta et al., 2011).

1.3.3. Autofagia em protozoários

Apesar de ser essencialmente estudada em leveduras e mamíferos, a maquinaria autofágica vem sendo investigada também em outros modelos celulares. Em protozoários patogênicos, tem sido demonstrada a importância da autofagia em diferentes processos como na diferenciação, patogenicidade e infecção. Nesse contexto, o papel crucial da via autofágica tem sido evidenciado em parasitos apicomplexa (ex: *Plasmodium sp.*, *Toxoplasma gondii*) e em tripanosomatídeos como os protozoários do gênero *Leishmania*, *T. brucei* e *T. cruzi* (revisto em Duszenko et al., 2011; Duque et al., 2013).

Análises genômicas e bioinformáticas apontaram a presença de genes ortólogos aos ATGs de leveduras e mamíferos em tripanosomatídeos (Herman et al., 2006). Inicialmente, não foi descrito o sistema ATG5-ATG12, contudo, mais recentemente a presença de algumas moléculas envolvidas nesse complexo já foram detectadas em *Leishmania* (Williams et al., 2009; 2012). Em *T. brucei*, agente etiológico da doença do

sono, a autofagia participa da diferenciação do parasito, degradando glicossomos, organelas semelhantes a peroxissomos que estão associados a glicogênese e metabolismo lipídico (Herman et al., 2008). Em diversas espécies do gênero *Leishmania*, a participação da via autofágica também foi descrita na metaciclologênese, sendo associada à virulência do patógeno (Besteiro et al., 2006; Williams et al., 2009). Em *T. cruzi*, os primeiros trabalhos também avaliaram a participação da autofagia em mecanismos de diferenciação do parasito, sendo observadas diferenças na expressão de Atg8 durante a metaciclologênese (Alvarez et al., 2008a). Mesmo apresentando um sistema incompleto de Atgs (Atg5, Atg10 e Atg12 não foram identificadas), ocorreu a formação do autofagossomo (Alvarez et al., 2008b). Entretanto, a importância da via autofágica não se restringe a diferenciação em *T. cruzi*. Muitos trabalhos mostram a autofagia frente a condições adversas como estresse nutricional, hipóxia e tratamento com drogas (Braga et al., 2005,2006; Santa-Rita et al., 2005; Menna-Barreto et al., 2007, 2009a,b; Sandes et al., 2010; Benitez et al., 2012; Fernandes et al., 2012; Veiga-Santos et al., 2012). Grande parte dos estudos avalia por microscopia eletrônica de transmissão a formação de estruturas autofágicas, entretanto a análise da marcação de vacúolos acídicos por monodansilcadaverina (MDC) e da expressão gênica de ATGs também vem sendo utilizadas. Contudo, a regulação pós-transcricional e a impossibilidade de realizar RNA de interferência em *T. cruzi* são empecilhos importantes para os estudos moleculares da via no parasito (DaRocha et al.,2004).

1.3.4. Xenofagia

Na última década, diversos estudos demonstraram a autofagia como mecanismo de eliminação de patógenos intra e extracelulares, representando assim um mecanismo importante de proteção para o hospedeiro. O processo autofágico já foi descrito na eliminação de microrganismos e substâncias secretadas como toxinas, contudo muitos patógenos utilizam dessa mesma maquinaria para o seu benefício (Gutierrez et al., 2004b, 2007; Deretic & Levine, 2009).

A xenofagia consiste na eliminação de microrganismos via autofagossomo. Toxinas e patógenos, seja no interior de fagossomos ou no citosol, são direcionados a PAS para posterior fusão lisosomal. O modo como a xenofagia sucede depende da sinalização provocada pelo microrganismo. Receptores de superfície associados ao

reconhecimento de patógenos (PRRs) como receptores do tipo *toll* (TLRs) são capazes de associar-se, por exemplo, à proteína beclina-1 e induzir o processo autofágico. Diferentes citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ e TNF- α , mais expressas durante a infecção, também contribuem para a ativação da via autofágica (revisto em Deretic & Levine, 2009). A maioria dos estudos avaliando a participação da autofagia na infecção por protozoários se concentra nos apicomplexa e tripanosomatídeos. Estudos realizados mostraram que em macrófagos ativados por CD40 ou IFN- γ /p-47 GTPase infectados por *T. gondii*, a autofagia provoca a eliminação do parasito, enquanto que em células Hela e fibroblastos, a autofagia fornece nutrientes para o parasito, favorecendo seu desenvolvimento (Wang et al., 2009, 2010; Zhao et al., 2009). Em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, a autofagia induz a proliferação parasitária. *In vivo*, o mecanismo de infecção parece ser dependente do processo autofágico, visto um aumento na expressão de LC3 na área da lesão (Cyrino et al., 2012; Pinheiro et al., 2009).

Em *T. cruzi*, dois processos distintos foram observados até o momento: a indução por rapamicina ou estresse nutricional reduziu a carga parasitária em células Hela infectadas por tripomastigotas metacíclicos (Figura 1.7) (Martins et al., 2011; Maeda et al., 2011; 2012).

Já em células de ovário de hamster chinês (CHO) infectadas por tripomastigotas de cultura mostraram colocalização do vacúolo parasitóforo e LC3 em períodos iniciais de infecção. Nesse último modelo celular, estímulos indutores de autofagia favorecem a invasão e proliferação do parasito, sendo reduzida a colocalização LC3-parasito na presença de inibidores de PI3K ou da polimerização de microtúbulos (Romano et al., 2009). A mesma associação protozoário-LC3 pode ser observada em células de linhagem Raw, HL-1 e H9C2 (macrófago murino, cardiomiócitos de camundongo e rato, respectivamente) infectadas com tripomastigotas (revisto em Romano et al., 2012). Dessa forma, a compreensão do papel da via autofágica em modelos de infecção por *T. cruzi* é relevante, sobretudo em modelos de cultura primária cardíaca, já que a literatura ainda se mostra controversa e escassa. Justifica-se ainda a análise comparativa da autofagia em células fagocíticas e não-fagocíticas fundamentais durante o ciclo evolutivo do parasito, visando compreender melhor o envolvimento desta via na relação *T. cruzi*-hospedeiro.

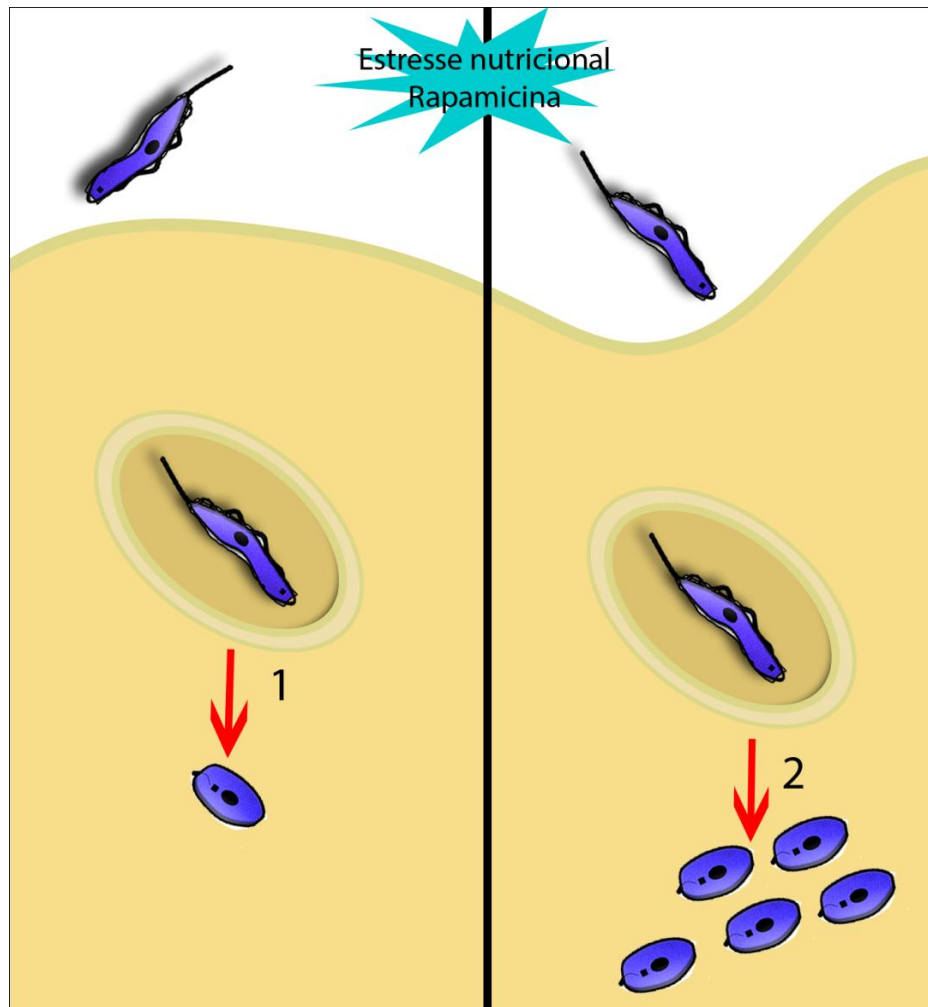


Figura 1.7. A autofagia na infecção por *T. cruzi*. A indução do processo de autofagia por estresse nutricional ou tratamento com rapamicina podem levar a: (1) menor proliferação de amastigotas (Maeda et al., 2011;2012; Martins et al., 2011) ou (2) maior índice de internalização de tripomastigotas.corroborado pela presença de Atg5, beclina-1 e LC3-PE (Romano et al.,2009; 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Investigar a participação do processo autofágico na interação do *T. cruzi*-células hospedeiras *in vitro*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da indução de autofagia (estresse nutricional e tratamento com rapamicina) sobre a infecção de macrófagos e cardiomiócitos em cultura usando microscopia de luz (campo claro) e microscopia eletrônica de transmissão.
- Avaliar a localização da proteína de autofagossomo LC3 em células infectadas por *T. cruzi* por microscopia de luz (fluorescência) e eletrônica de transmissão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Parasitos

Em todos os experimentos foram utilizadas formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, obtidos por punção cardíaca de camundongos *Swiss*, no pico da parasitemia (7º dia pós-infecção), conforme procedimento de rotina do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz-RJ).

3.2. Cultura de células

Macrófagos peritoneais foram obtidos por lavado peritoneal de camundongo *Swiss*, sendo as células ressuspensas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), quantificadas e plaqueadas (3×10^5 em lamínulas de 12 mm ou 1×10^6 em placa de petri 35 mm) por 1h a 37°C para adesão. Após lavagens em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2), as células foram mantidas em DMEM (Gibco) contendo 10% soro fetal bovino (SFB, LGC-Bio), 4mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 1000U/ml de penicilina e estreptomicina 50µg/mL (HyClone) por 24h em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂ (Araújo-Jorge et al., 1989).

Cardiomiócitos embrionários (HMC: *Heart muscle cells*) foram obtidos de átrios de corações de embriões (18º- 21º dia) de camundongos *Swiss*, submetidos à dissociação mecânica e enzimática em PBS suplementado com 0,05% tripsina (Sigma-Aldrich) e 0,01% colagenase tipo 2 (Worthington – CLS2) a 37°C. Após a obtenção das células, estas foram plaqueadas ($1,5 \times 10^5$ em lamínulas de 12 mm ou 1×10^6 em placa de petri 35 mm) e mantidas a 37°C por 24h na estufa com 5% CO₂ em meio DMEM suplementado com 10% SFB, 1mM CaCl₂, 1mM L-glutamina, 2% extrato de embrião de pinto, 1000U/mL de penicilina e estreptomicina 50µg/mL (Meirelles et al., 1986).

3.3. Indução de autofagia

Foram utilizados como indutores de autofagia a rapamicina (Sigma-Aldrich) e o meio DMEM sem glicose e não suplementado com SFB e L-

glutamina (DMEM^{-/-}) (Gibco). A escolha da concentração e tempo máximos de incubação dos indutores foi definida através de ensaios de citotoxicidade em células não infectadas pelo método do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich). Após os tempos de 24h para macrófagos e 48h para cardiomiócitos, foi adicionado 0,5 mg/mL MTT por 4h a 37°C, sendo a reação interrompida pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck). A leitura foi realizada a 490nm no espectrofotômetro Spectramax384 (Device Molecules) (Menna-Barreto et al., 2009b).

Para exacerbar a autofagia nas células de cultura primária infectadas, foram utilizados dois protocolos, onde a via foi induzida com 20 ng/μL de rapamicina ou DMEM^{-/-} antes e depois da infecção (Figura 3.1). No primeiro, macrófagos e células cardíacas foram lavadas em PBS e pré-incubadas por 2h em estufa a 37°C, 5% CO₂ com indutores da via autofágica, mantendo a incubação durante a infecção (Gutierrez et al., 2004b; Maruyama et al., 2008). Alternativamente, a indução de autofagia foi realizada por 24h após a infecção. Em ambos os protocolos, os dois tipos celulares foram infectados na proporção de 10 tripomastigotas por célula, sendo o tempo máximo de interação parasito-célula hospedeira de 6 e 24h para macrófagos e HMC, respectivamente. O tempo de indução de autofagia também variou entre os dois tipos celulares, oscilando entre 6 e 24h para macrófagos, enquanto para cardiomiócitos variou entre 18 e 48h.

Dessa forma foram estabelecidos três grupos: células Controle, infectadas apenas; células Rapamicina, infectadas e células DMEM^{-/-} infectadas. A proporção de 10 parasitos/ célula hospedeira foi utilizada em todos os ensaios realizados e a incubação com rapamicina ou DMEM^{-/-} foi mantida por todo tempo de experimento.

Após os diferentes tempos de incubação, as células foram lavadas três vezes em PBS, fixadas com metanol, coradas pelo método do panótico rápido (Laborclin) e quantificadas no microscópio de campo claro Zeiss AxioLab A1 (Zeiss) para posterior análise dos parâmetros de % de células infectadas (células infectadas por células totais) e o número de parasitos por 100 células. Foram realizados pelo menos 5 experimentos em duplicata, sendo quantificadas 300 células por lamínula.

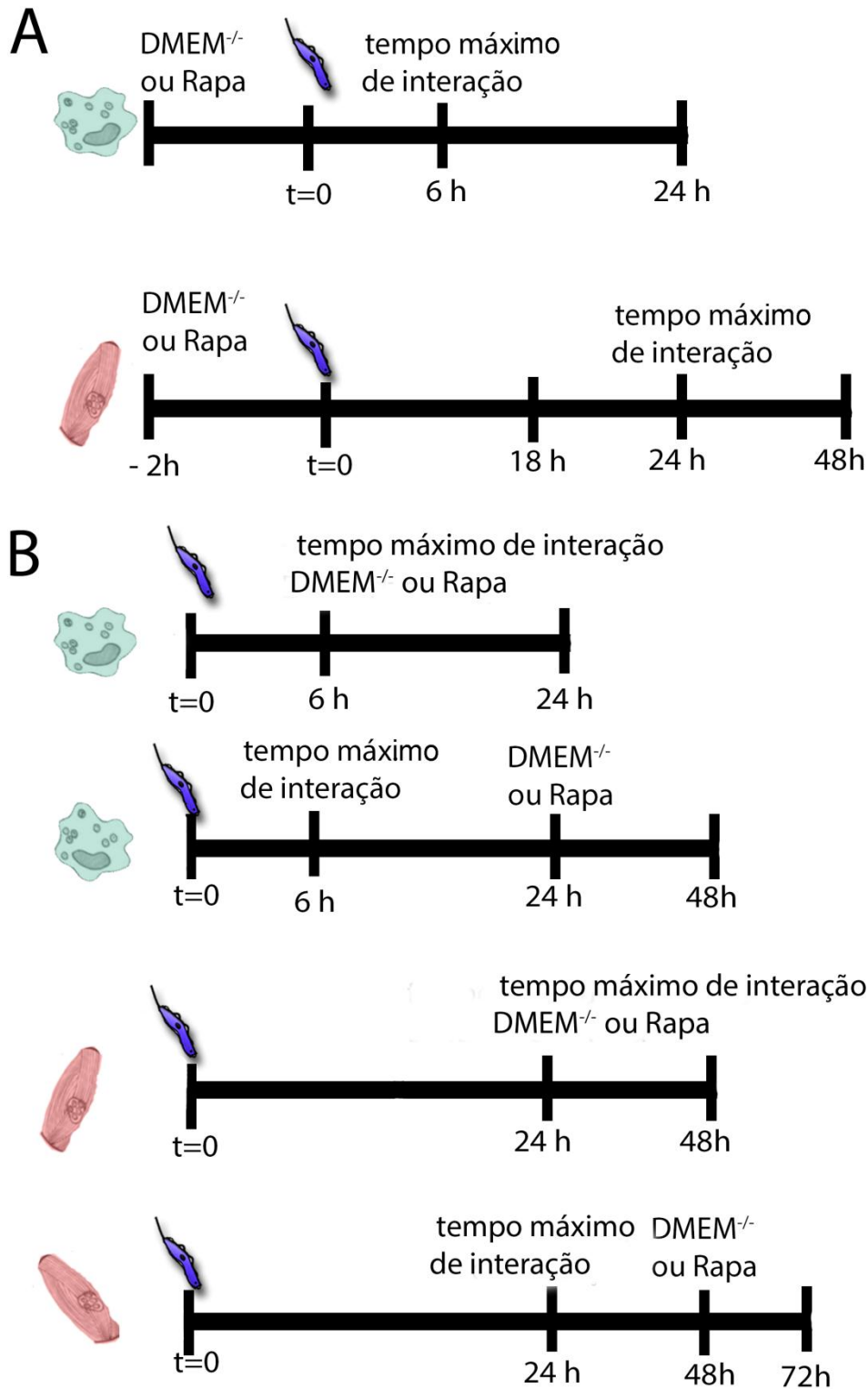


Figura 3.1. Desenho experimental para indução de autofagia. Indução pré-infecção (A) ou pós-infecção (B).

3.3.1. Imunofluorescência

Para a análise da presença da proteína de autofagossomos LC3, as células que sofreram estímulo pré-infecção foram lavadas em PBS e fixadas a 25°C por 20 min em solução de paraformaldeído a 4%. Após novas lavagens em PBS, as células foram permeabilizadas e bloqueadas por 1h, sob agitação a 4°C, em solução de bloqueio [PBS contendo de 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 0,1% Tween 80 (AMRESCO), 2% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich), 5% SFB, 10% soro de carneiro]. Após lavagem em tampão contendo as mesmas concentrações de Tween 80 e Triton X-100, as células foram incubadas por 1h com anticorpo primário contra LC3A produzido em coelho (Sigma-Aldrich, concentração final - 0,5 µg/mL, número de catálogo L8793). Após novas lavagens, as lamínulas foram incubadas por 1h com anticorpo secundário contra coelho produzido em cabra acoplado ao fluorocromo Alexa Fluor 488 (Invitrogen, concentração final - 1,3 µg/mL). A marcação do núcleo das células foi feita utilizando 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, concentração final - 0,2 µg/mL). Todas as lâminas foram montadas em meio de montagem octano do diazabicyclo 1.4 [2.2.2] (DABCO, Sigma-Aldrich) e analisadas no microscópio de fluorescência Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss), com sobreposição de imagens, incluindo contraste de interferência diferencial (DIC). Nesses ensaios foram quantificados o percentual de células LC3-positivas e o percentual de células LC3 associadas ao parasito (%LC3+, parasito+). Foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes em duplicata, quantificando no mínimo 200 células/ lamínula. Para controle, o anticorpo primário foi substituído por um anticorpo irrelevante de coelho (Sigma) na mesma concentração e pelo mesmo tempo.

3.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

3.3.2.1. MET convencional

Após a indução de autofagia pré-infecção em macrófagos (1×10^6 células, 6 e 24h) e células cardíacas (1×10^6 células, 24 e 48h), sendo as células

lavadas em PBS, e fixadas por 40 min a 25°C, em solução de glutaraldeído a 2,5%, diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Após três lavagens no mesmo tampão, as células foram pós-fixadas por 20 min em solução de tetróxido de ósmio a 1%, contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio e 2,5mM de cloreto de cálcio. Após novas lavagens em tampão, as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (50%, 70%, 90%, 100%, 100%) (5 min em cada). Após a raspagem, o sedimento foi infiltrado em resina Polybed 812 (Polysciences) polimerizando por 72 h a 60°C. Cortes ultrafinos de 70-100 nm de espessura foram obtidos no ultramicrotomo ULTRACUT S (Leica) e recolhidos em grades de cobre. Em seguida, as grades foram contrastadas com 1% de acetato de uranila e citrato de chumbo para análise no microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (Jeol) (Menna-Barreto et al., 2009b).

3.3.2.2. Imunomarcção ultraestrutural

Imunomarcção ultraestrutural para LC3A foi realizada usando-se o mesmo anticorpo primário usado para imunofluorescência, conforme descrito no item 3.3.1. A imunomarcção foi feita antes das etapas de desidratação e inclusão (*pre-embedding*) usando-se partículas diminutas de ouro com diâmetro de 1.4nm (*immunogold*) de acordo com trabalhos prévios do grupo (Melo et al., 2005, 2009).

Suspensões de células cardíacas infectadas e controles não infectadas foram fixadas em solução contendo 1% de glutaraldeído e 1% de formaldeído, incluídos em ágar a 2% para obtenção de pellets. Estes foram imersos em solução de sacarose a 30% durante a noite, e congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente, secções com espessura de 10 µm (monocamadas) foram obtidas em criostato e coletadas sobre lâminas revestidas (Superfrost, Fisher). Todas as etapas da imunomarcção foram feitas sobre as monocamadas, à temperatura ambiente. As secções foram incubadas em tampão PBS a 0,02M por 5 min, seguida por solução de PBS contendo glicina (Sigma) por 10 min, e depois por uma solução de bloqueio contendo PBS a 0,02M, albumina de soro bovino (BSA, Electron Microscopy Sciences) a 1% e gelatina (Sigma) a 0,1% (tampão PBS-BSA) durante 20 min. Posteriormente, as células foram incubadas em uma segunda solução de bloqueio contendo

tampão PBS-BSA mais 10% de soro normal de carneiro (NGS) durante 30 min, seguida por incubação com anticorpo primário (concentração final de 10 µg/mL) por 1h. Após três lavagens de 5 min com tampão PBS-BSA-NGS, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho, com fragmento Fc associado a partículas de ouro de 1.4 nm (Nanogold, Nanoprobes), diluído 1:100, durante 1h. Para controle da imunomarcação, o anticorpo primário foi substituído por um anticorpo irrelevante de coelho (Sigma) na mesma concentração e pelo mesmo tempo. Após lavagem em tampão PBS-BSA (3 X 10 min) e PBS (3 X 5 min), as células foram fixadas em glutaraldeído a 2% em PBS por 10 min, imersas em água (3 X 5 min) e submetidas à etapa de nucleação pela prata (HQ *silver enhancement*, Nanoprobes) conforme orientações do fabricante. Esta etapa permite a visualização das partículas de ouro. Em seguida, as células foram colocadas em solução de tiosulfato de sódio (Sigma) a 5% por 3 min e imersas em água destilada, antes do processamento convencional para MET.

Todos os procedimentos para MET foram feitos sobre as secções. Como primeira etapa, as células foram pós-fixadas em solução de ósmio em água destilada (1:1) por 10 min, seguida por lavagem em água destilada e contrastação em bloco com acetato de uranila a 2% por 5 min. Após desidratação em série crescente de álcool (50, 70, 95 e 100%), as células foram infiltradas com uma mistura de Epon e óxido de propileno (2:1) durante 15 min e incluídas em resina Eponate (Eponate 12, Ted Pella), a partir da inversão de cápsulas contendo a resina sobre as lâminas. Após polimerização durante 16 a 60 h, as cápsulas foram destacadas da superfície das lâminas e os blocos obtidos cortados em ultramicrótomo (Leica). Os cortes ultrafinos foram montados em grades de cobre e analisados em microscópio eletrônico de transmissão (CM10, Philips) a 60 Kv.

3.3.3. Avaliação da presença de corpúsculos lipídicos (CLs)

Para avaliação da presença de CL durante a indução de autofagia pré-infectadas por *T. cruzi*, as células foram lavadas três vezes em PBS, fixadas em paraformaldeído 4% por 10 min a 25°C e lavadas em água destilada. A

coloração dos corpúsculos foi realizada com tampão cacodilato 0,1M e tetróxido de ósmio 1,5% por 30 min, seguida pela lavagem com água destilada e posterior coloração com tiocarbohidrazida 1% (TCH - Sigma-Aldrich) por 5 min. Uma nova coloração em tampão cacodilato 0,1M e tetróxido de ósmio 1,5% por 3 min foi realizada antes da lavagem em água tridestilada e montagem das lâminas. A contagem dos corpúsculos lipídicos foi realizada em microscopia de campo claro, quantificando 50 células por lamínula (D'Ávila et al., 2008). A quantificação dos CL foi confirmada por microscopia de fluorescência através da marcação com BODIPY® 493/503 (Invitrogen, concentração final - 10 μ M) (Melo et al., 2011b).

3.3.4. Análise estatística

Todos os dados numéricos obtidos estão apresentados na forma de média \pm erro padrão. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para duas amostras independentes não-paramétricas, com nível de significância considerado de $p \leq 0.05$. A comparação dos dados coletados foi feita entre grupos controle e indução de autofagia (rapamicina e DMEM^{-/-}).

3.3.5. Aspectos éticos

Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com as condições de biossegurança adequadas para execução do trabalho, sendo que os referidos experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Fiocruz (licença L-028/09).

4. RESULTADOS

4.1. Análise de citotoxicidade

A análise de citotoxicidade pela técnica do MTT demonstrou que tanto macrófagos peritoneais quanto células cardíacas apresentaram viabilidade superior a 80% na concentração de 20 ng/ μ L de rapamicina, mesma percentagem encontrada após a incubação com DMEM^{-/-}. Com estas análises, além de definir a concentração de uso da rapamicina (20 ng/ μ L), ainda foram definidos os tempos máximos de indução de autofagia para cada tipo celular, respeitando o descrito na Figura 3.1.

4.2 Avaliação do efeito da indução de autofagia na infecção e proliferação intracelular do *T. cruzi*

Inicialmente foi realizada a incubação com indutores de autofagia por 2h antes da infecção. Em macrófagos peritoneais, tanto DMEM^{-/-} como rapamicina reduziram significativamente a infecção a partir de 6h, levando a um decréscimo de cerca de 60-72% (Figura 4.1A). Todavia, ao analisar a parasito/100 células, a redução observada foi ainda mais acentuada alcançando mais de 80% de inibição após 24h (Figura 4.1B). Resultados semelhantes foram encontrados em células cardíacas quando a autofagia foi induzida antes da infecção. Uma redução da infecção foi observada após o tratamento com rapamicina a partir de 24h. Nas células infectadas e pré-incubadas com DMEM^{-/-}, houve uma maior infecção no tempo inicial de 18h, que se manteve nos demais tempos. Entretanto, o mesmo perfil de redução foi detectado em 24 e 48h (Figura 4.2A). O parâmetro parasito/100 células reproduziu o resultado, sendo em 24 e 48h já observadas diferenças estatísticas entre o grupo controle e os induzidos para autofagia, sendo a redução de 2x e 8x para DMEM^{-/-} e rapamicina em 48h, respectivamente (Figura 4.2B).

Posteriormente, foi avaliado também o efeito da indução de autofagia pós-infecção, após o estabelecimento do parasito na célula hospedeira. Neste desenho experimental, rapamicina e DMEM^{-/-} não inibiram a infecção de macrófagos em 24h, sendo observada uma redução após o tratamento com a droga por 48h (Figura 4.3A). Não houve diferença significativa nas taxas endocíticas entre controle e as demais condições experimentais em nenhum dos tempos testados (Figura 4.3B). Entretanto, quando foi avaliado efeito da autofagia em células cardíacas no protocolo pós-infecção, observou-se a inibição da infecção tanto em rapamicina quanto em DMEM^{-/-} em 48 e 72h (Figura 4.4A). A análise do parâmetro parasitos/100 células em cardiomiócitos apontou uma redução acentuada apenas em 72h, alcançando 86,2% e 46% em rapamicina e DMEM^{-/-}, respectivamente (Figura 4.4B).

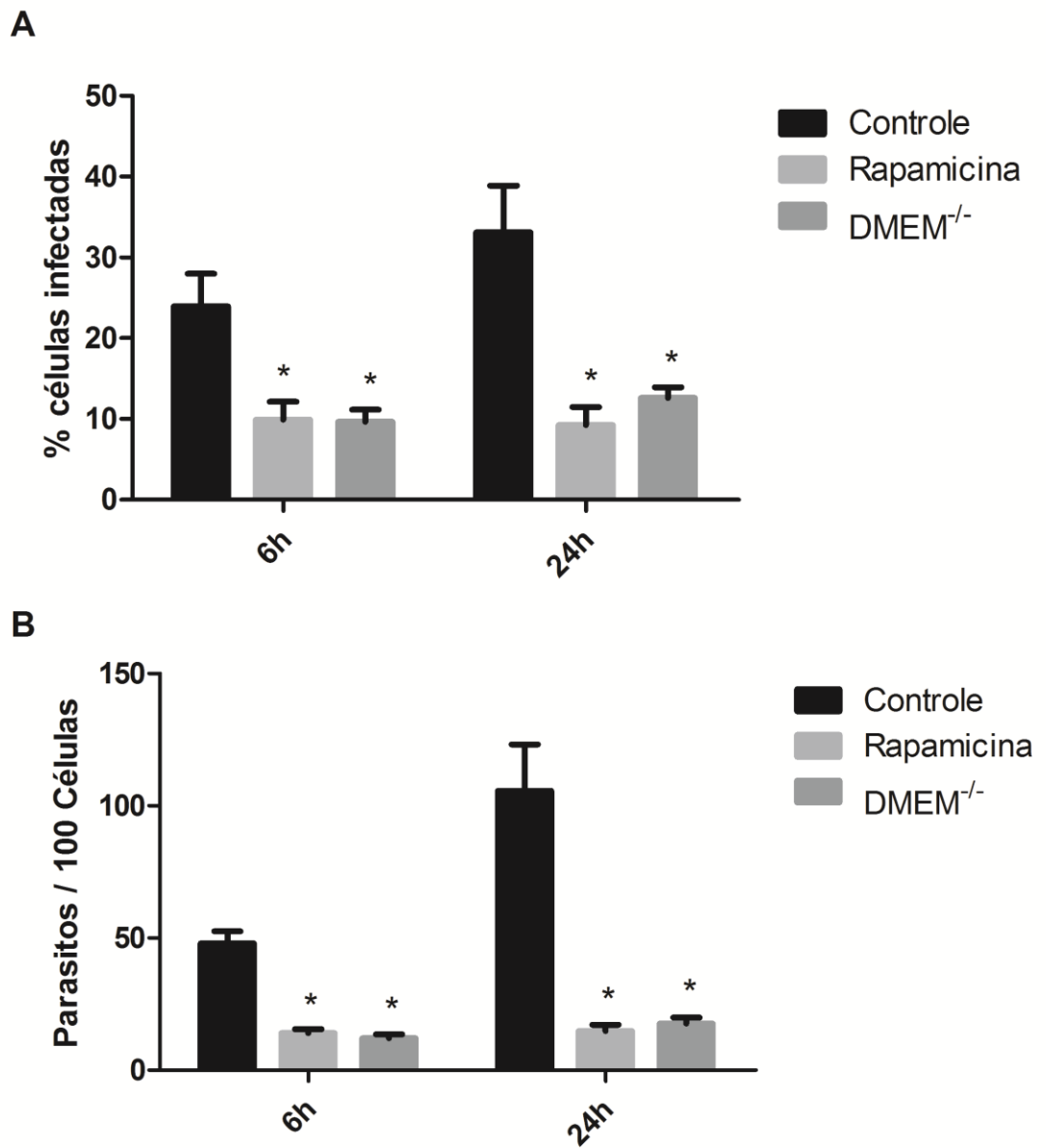


Figura 4.1. Avaliação da indução de autofagia pré-infecção por *Trypanosoma cruzi* em macrófagos peritoneais. Tratamentos com rapamicina e meio de estresse nutricional (DMEM^{-/-}) foram realizados 2h antes da infecção (A) % Células infectadas; (B) Parasitos/100 células (* p<0,05).

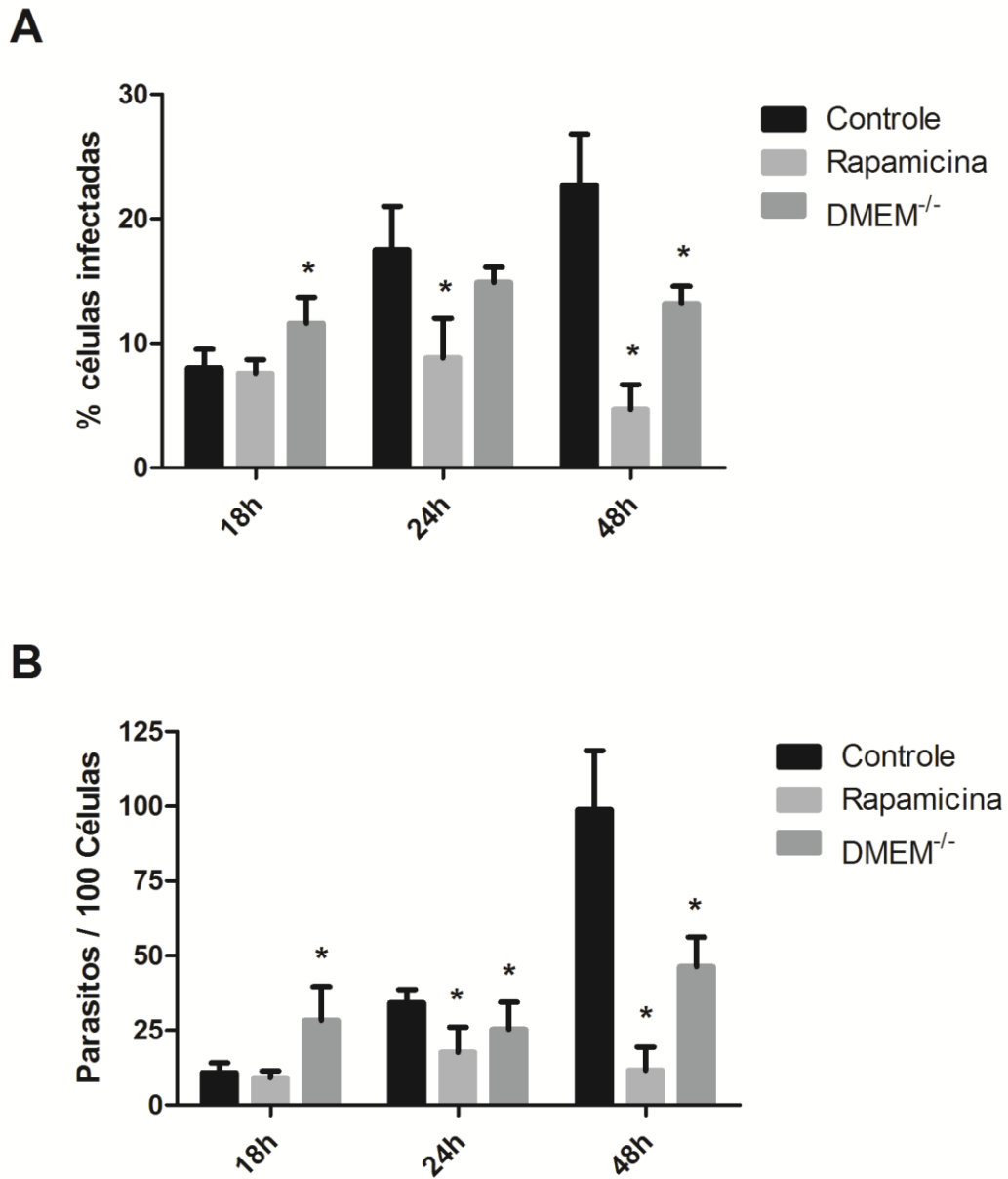


Figura 4.2. Avaliação da indução de autofagia pré-infecção por *Trypanosoma cruzi* em células cardíacas. Tratamentos com rapamicina e meio de estresse nutricional (DMEM^{-/-}) foram realizados 2h antes da infecção (A) % Células infectadas; (B) Parasitos/100 células (* p<0,05).

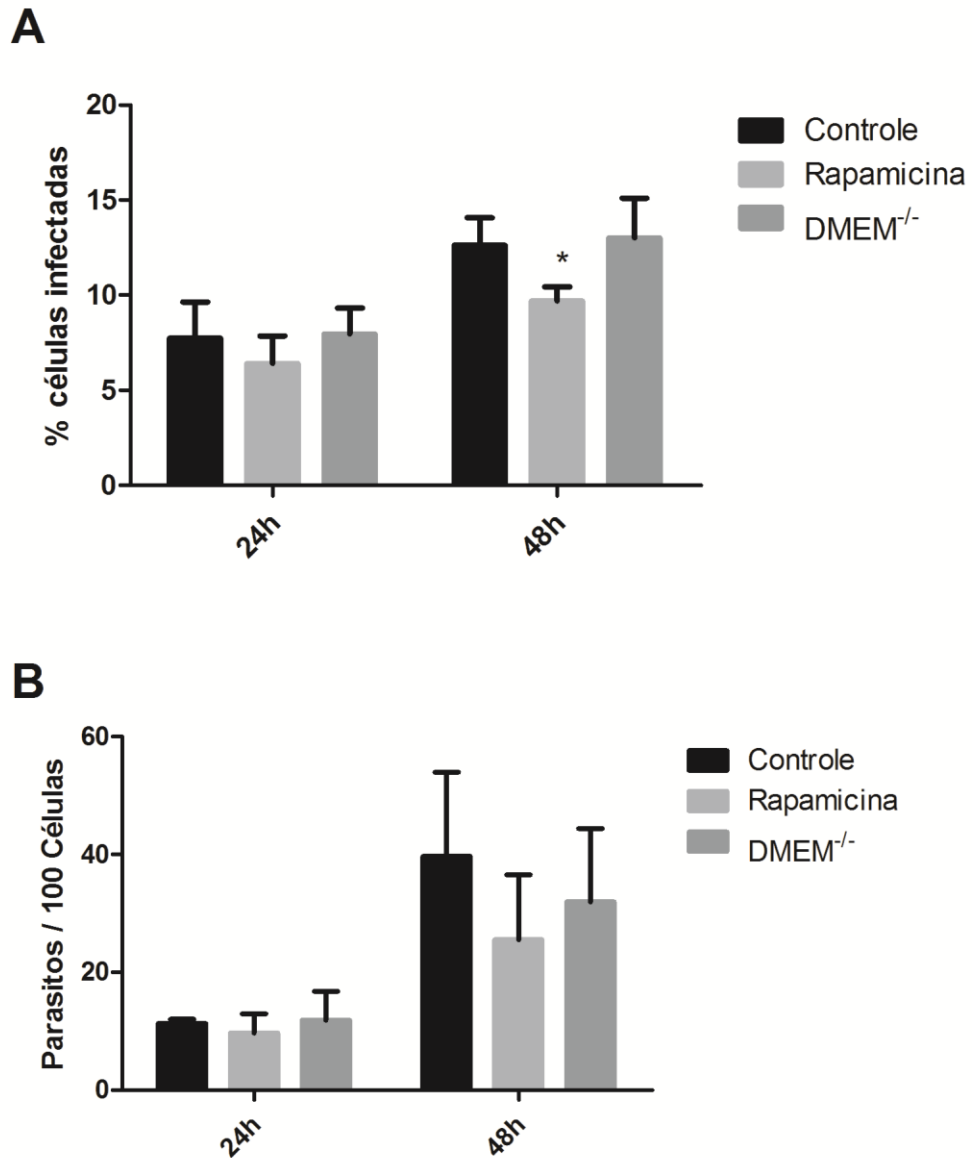


Figura 4.3. Avaliação da indução de autofagia pós-infecção por *Trypanosoma cruzi* em macrófagos peritoneais. Tratamentos com rapamicina e meio de estresse nutricional (DMEM^{-/-}) foram realizados após infecção (A) % Células infectadas; (B) Parasitos/100 células (* p≤0,05).

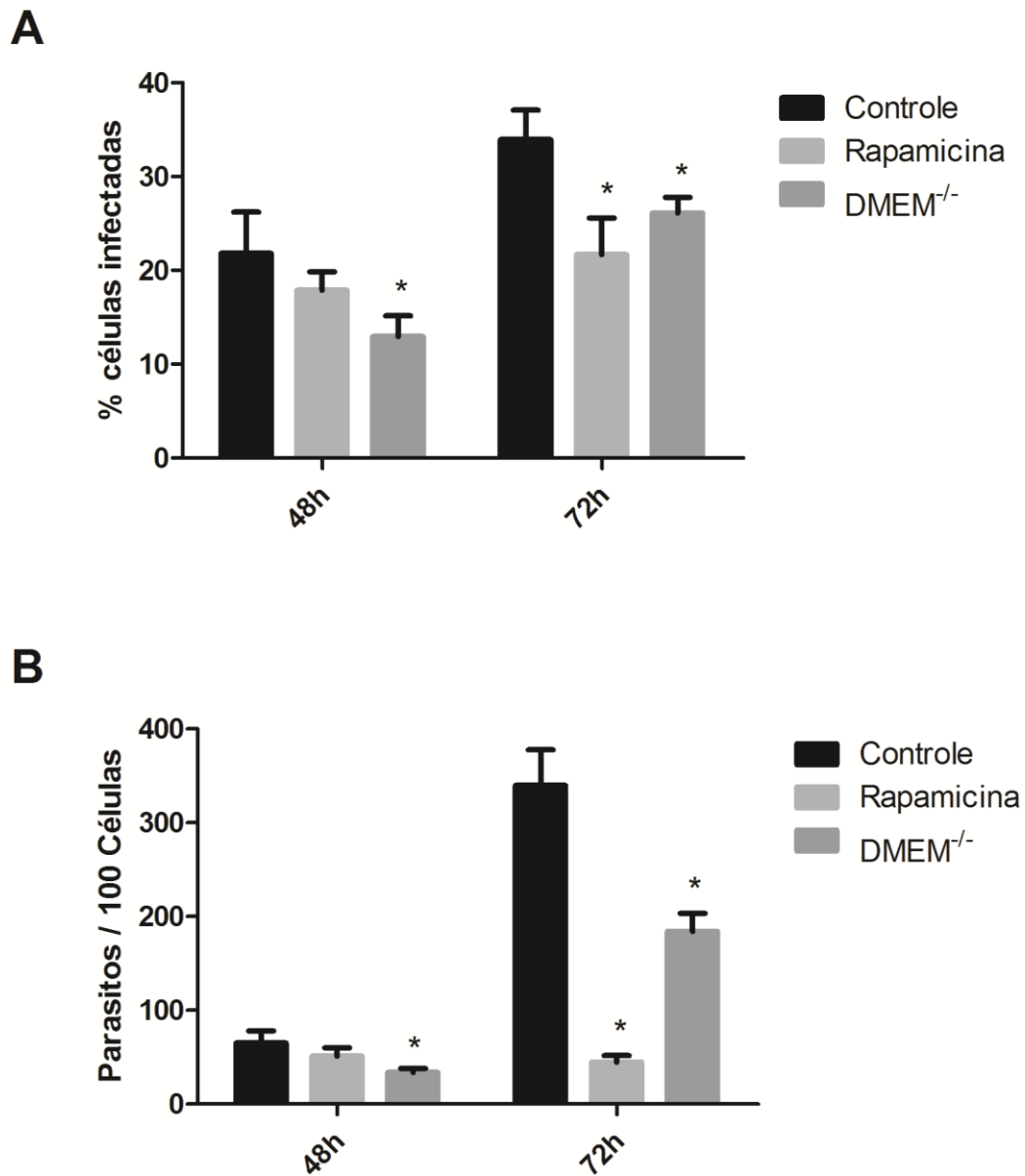


Figura 4.4. Avaliação da indução de autofagia pós-infecção por *Trypanosoma cruzi* em células cardíacas. Tratamentos com rapamicina e meio de estresse nutricional (DMEM^{-/-}) foram realizados após infecção (A) % Células infectadas; (B) Parasitos/100 células (* p<0,05).

4.3. Análise ultraestrutural do efeito da indução de autofagia em macrófagos e células cardíacas infectados por *T. cruzi*

O efeito do tratamento com a rapamicina bem como da incubação em DMEM^{-/-} foram analisados em macrófagos e células cardíacas nos diferentes tempos estudados por microscopia eletrônica de transmissão utilizando o desenho experimental da indução de autofagia pré-infecção.

No tempo de 6h, macrófagos controles apenas infectados apresentaram morfologia típica, contendo formas tripomastigotas também com aparência normal (Figura 4.5A). Um grande número de perfis de retículo endoplasmático e mitocôndrias foram observados por todo o citosol, inclusive próximo ao parasito (Figuras 4.5A,B). Estruturas membranares concêntricas, CLs e autofagossomos também foram detectados (Figuras 4.5B-D). Os CLs aparecem como estruturas geralmente arredondadas e elétron-densas e são caracterizados pelo fato de não apresentarem membrana envoltória típica trilaminar, mas apenas uma hemi-membrana. Já os autofagossomos são caracterizados pela presença de membrana circundando material em decomposição, muitas vezes apresentando mais de uma membrana.

O tratamento anterior à infecção com rapamicina induziu a formação de autofagossomos de diferentes tamanhos e graus de degradação (Figuras 4.6A,B, 4.7B-D, 4.8A,B). A rapamicina também levou a um aumento da proporção de estruturas membranares concêntricas (Figuras 4.6A,C), destacando também a presença de CLs (Figuras 4.7D, 4.8A) além de promover o aparecimento de vacúolos alongados e ramificados (Figura 4.7A) e desorganização do Golgi (Figuras 4.6C,D). Foram ainda observados vacúolos parasitóforos contendo parasitos, alguns fundindo-se a estruturas concêntricas contendo membrana dupla, além de ter sido detectada a presença de um axonema flagelar no interior de um autofagossomo (Figuras 4.8A,B).

As células incubadas em DMEM^{-/-} apresentaram morfologia do *T. cruzi* semelhante ao controle (Figuras 4.9A, 4.10C,D). O tratamento exacerbou a gênese de autofagossomos. Alguns autofagossomos continham estruturas concêntricas em seu interior (Figuras 4.9B-D). Já os CLs foram frequentemente

encontrados circundados por perfis de retículo endoplasmático (Figuras 4.9B, 4.10A-C).

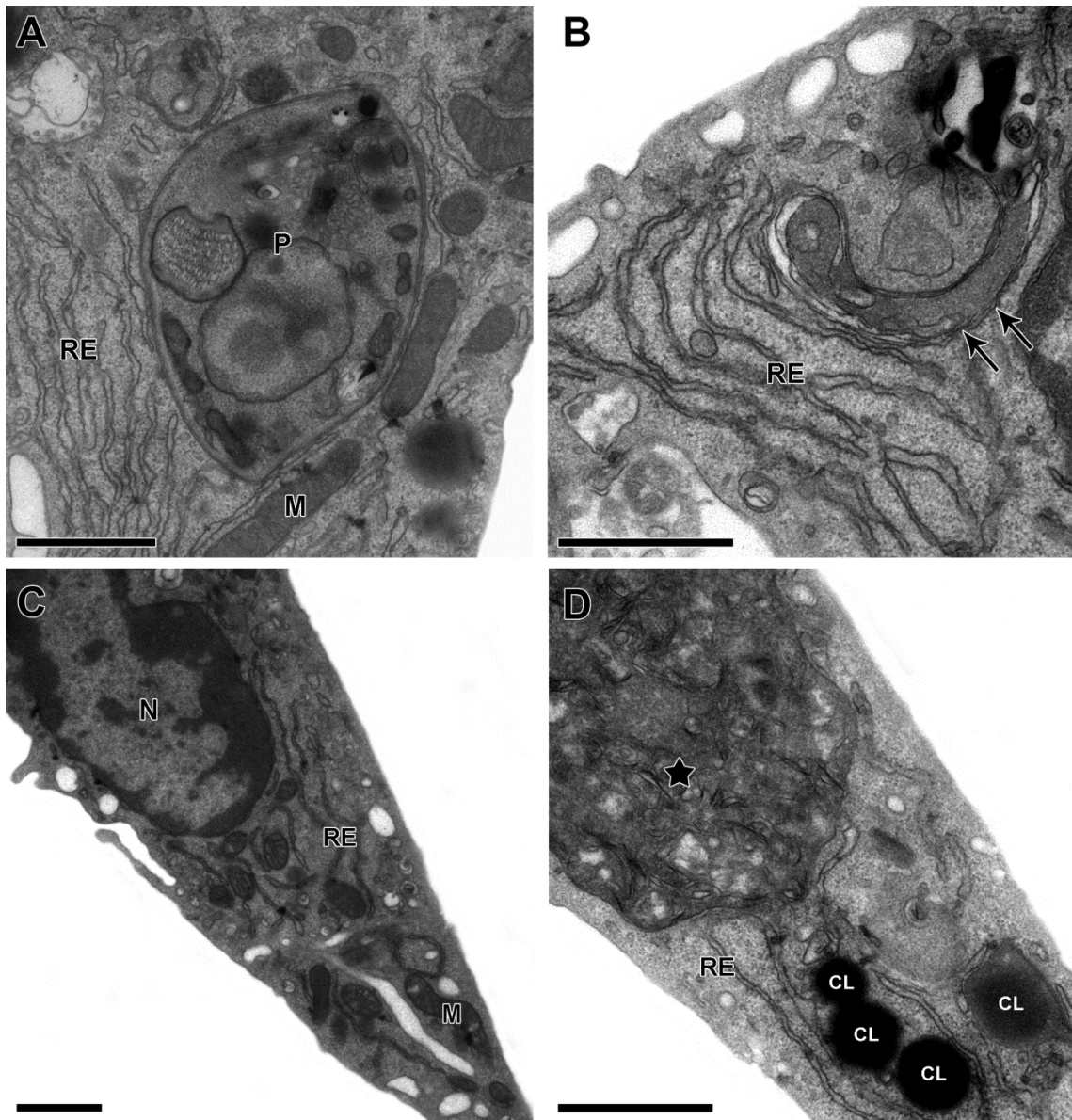


Figura 4.5. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais 6h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. (A) Presença de um tripomastigota (P) com morfologia característica, próximo a perfis de retículo endoplasmático (RE) e mitocôndria (M). (B-D) Grande número de perfis de retículo endoplasmático (RE), formando estruturas membranares concêntricas (setas pretas), assim como um número maior de corpúsculos lipídicos (CL) e autofagossomos (estrela preta) também foram observados. N: núcleo; M: mitocôndria. Barras: 1 μ m.

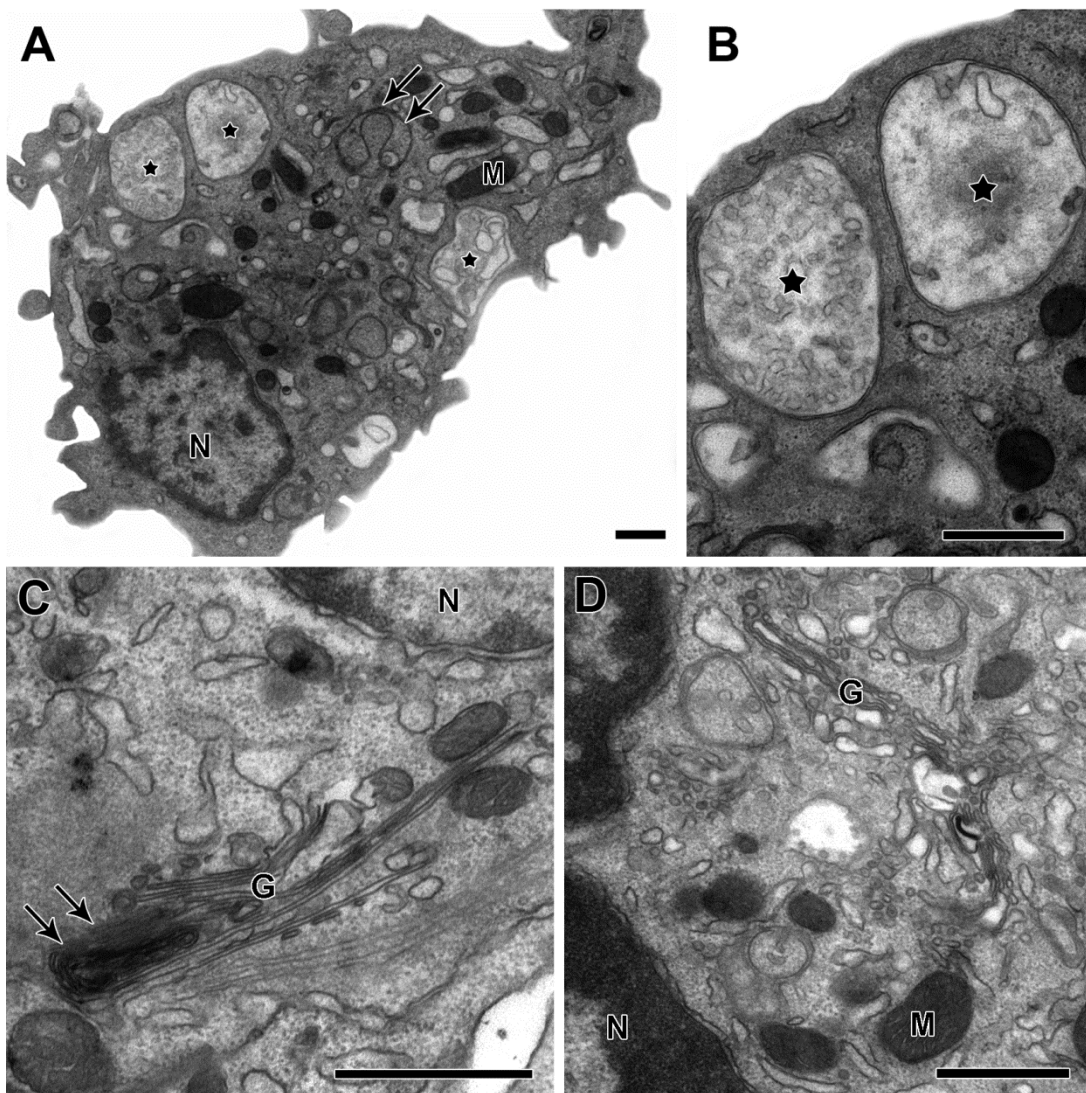


Figura 4.6. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-tratados com rapamicina, 6h após a infecção com *Trypanosma cruzi*. **(A)** Visão geral de um macrófago infectado pré-tratado contendo diversos autofagossomos (estrelas pretas) e estruturas membranares concêntricas (setas). **(B)** Em maior aumento, os autofagossomos em diferentes estágios de degradação (estrelas pretas). **(C)** Observe a presença de estruturas membranas concêntricas (setas), próximas ao Golgi (G), o qual apresentou-se com cisternas desorganizadas. **(D)** Organelas também apresentaram morfologia característica N: núcleo; M: mitocôndria. Barras: 0,75 μ m.

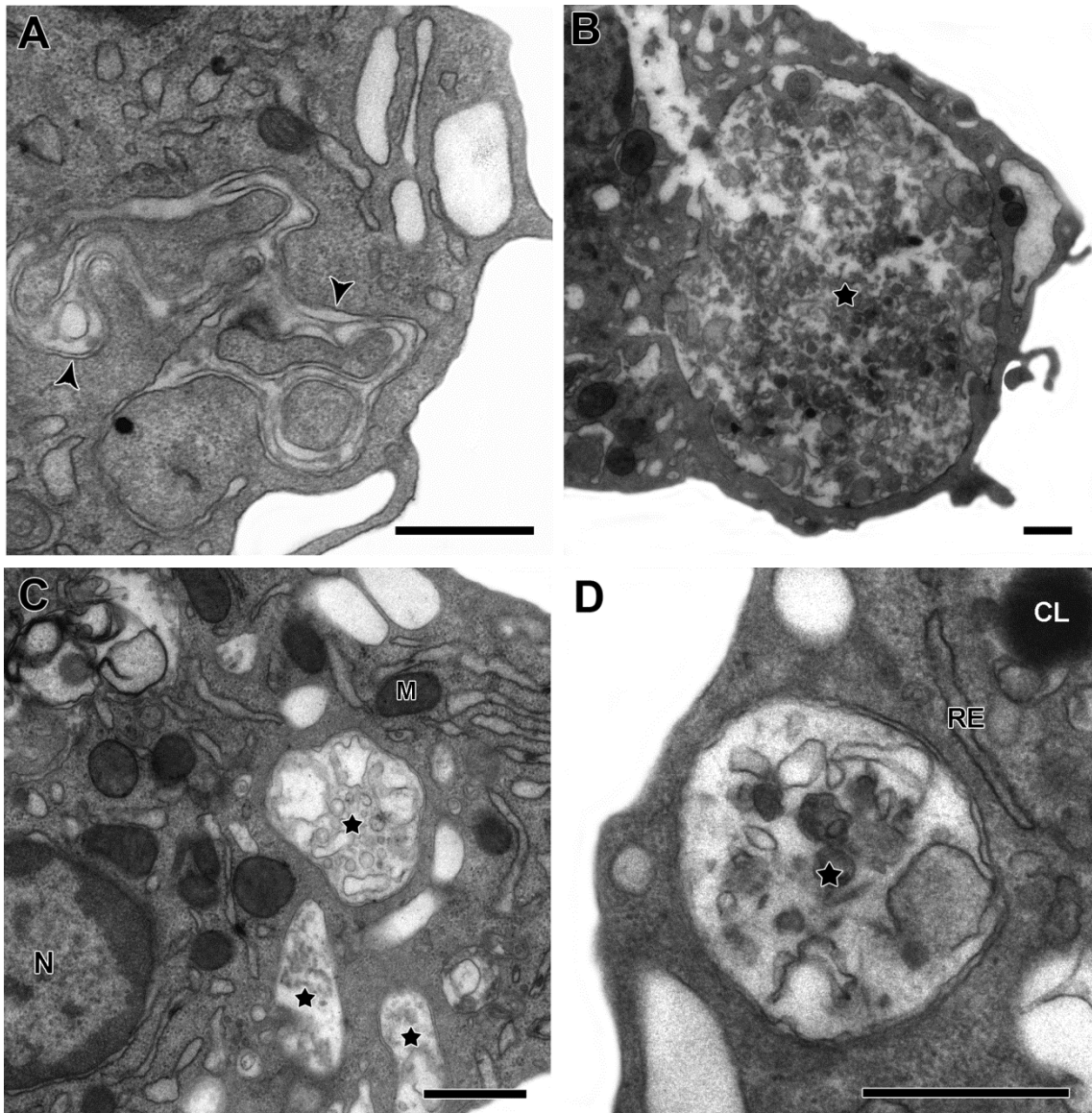


Figura 4.7. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-tratados com rapamicina, 6h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. (A) o tratamento induziu o aparecimento de vacúolos tubulares ramificados (cabeças de setas) dispersos pelo citosol. (B-D) Inúmeros autofagossomos (estrelas pretas) em diferentes estágios de degradação também foram observados em células tratadas. CL: corpúsculo lipídico; N: núcleo; M: mitocôndria; RE: retículo endoplasmático. Barras: 0,75 μ m.

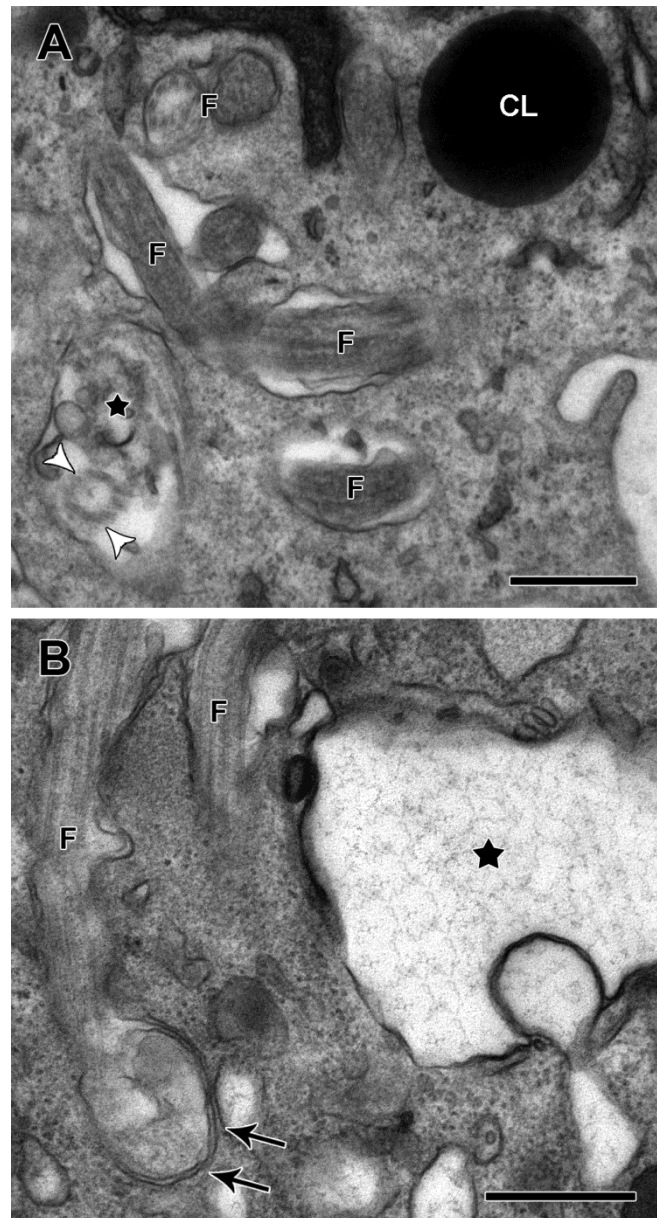


Figura 4.8. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-tratados com rapamicina, 6h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. **(A)** Flagelos de parasitos (F) foram observados no interior de vacúolos parasitóforos, sendo ainda observada a presença de um axonema (cabeças de setas brancas) dentro de um autofagossomo (estrela preta). **(B)** O aparecimento de uma estrutura concêntrica contendo membrana dupla (setas pretas) fundindo com o vacúolo parasitóforo também foi detectado próximo a um autofagossomo (estrela preta) em um macrófago tratado. CL: corpúsculo lipídico da célula hospedeira. Barras: 0,5 μ m.

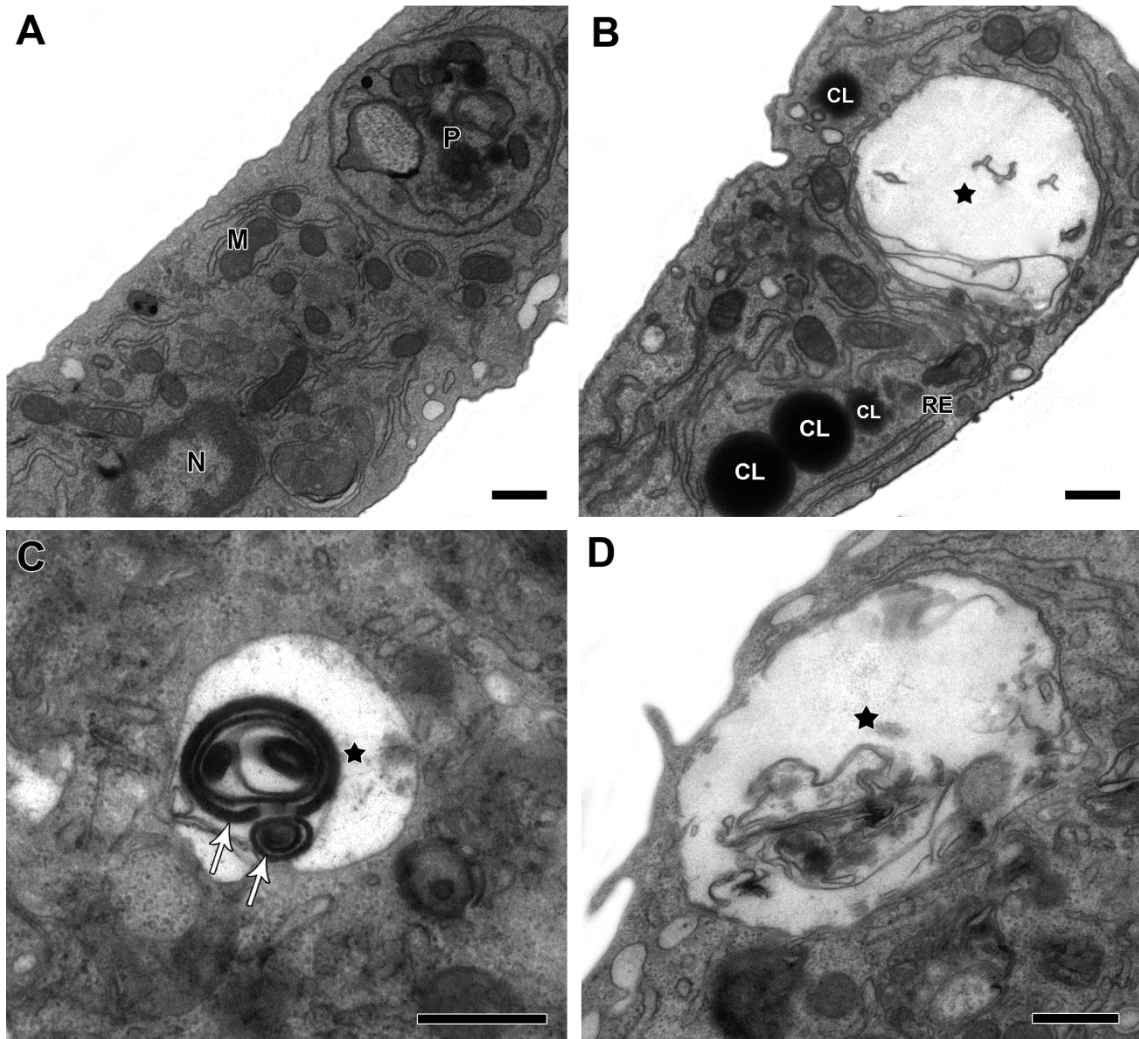


Figura 4.9. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-incubados em DMEM^{-/-}, 6h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. (A) Morfologia típica de um tripomastigota (P) no interior de uma célula. (B-D) A indução de estresse nutricional indicou a presença de corpúsculos lipídicos (CL) e autofagossomos (estrelas pretas), sendo observadas estruturas membranares concêntricas no seu interior (setas brancas). N: núcleo; RE: retículo endoplasmático da célula hospedeira. Barras: 0,5µm.

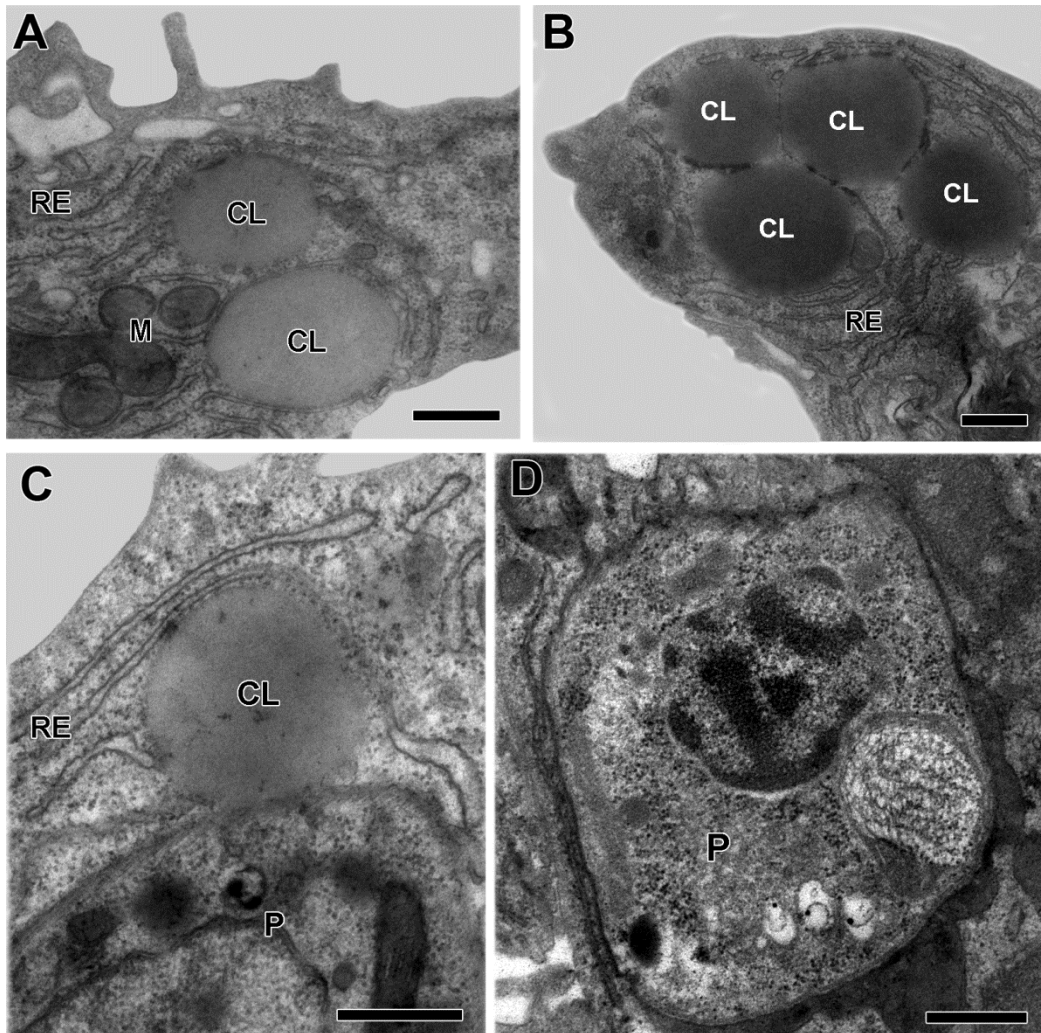


Figura 4.10. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-incubados em DMEM⁻, 6h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. (A,B) O estresse nutricional levou a um aumento de corpúsculos lipídicos (CL) circundados por retículo endoplasmático (RE). (C) Observe CL na proximidade parasito (P). (D) Forma tripomastigota intracelular (P) com morfologia normal. M: mitocôndria. Barras: 0,5 μ m.

No tempo de 24h pós-infecção, foi possível visualizar um número maior de parasitos por macrófago no grupo controle, apresentando morfologia normal. Os parasitos observados já apresentaram características de formas amastigotas (Figuras 4.11A,B).

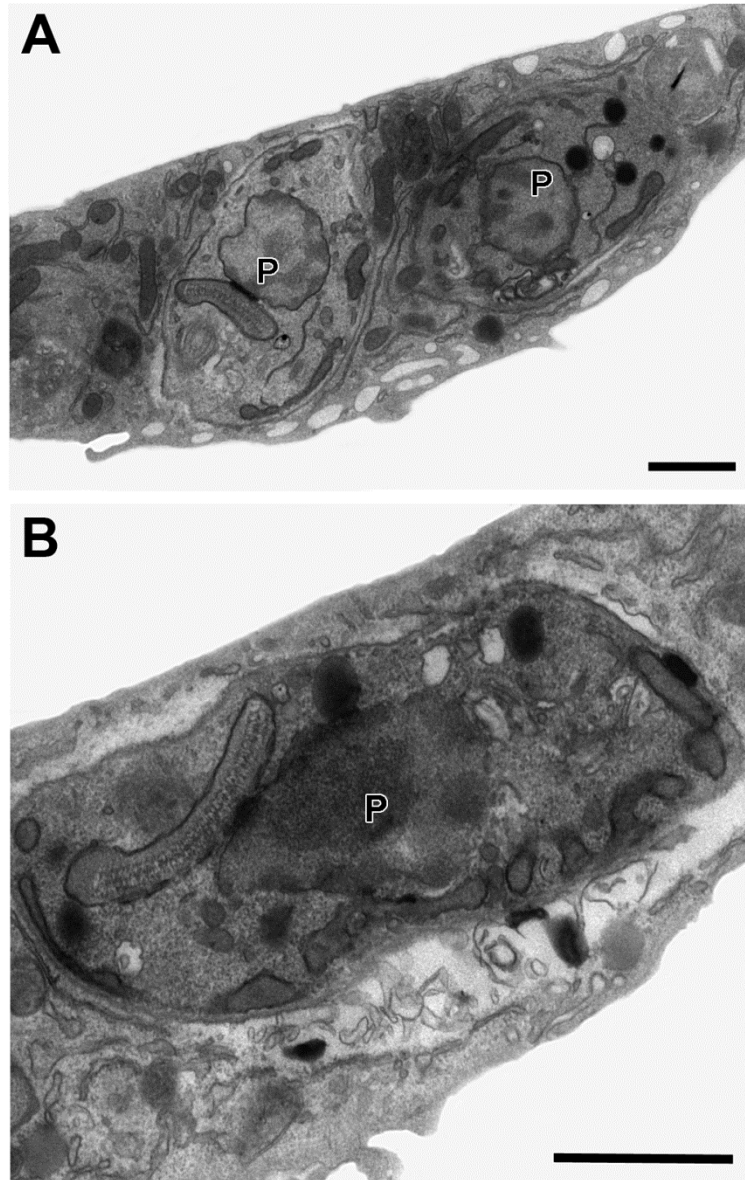


Figura 4.11. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. (A,B) Macrófagos contendo formas amastigotas (P) apresentando morfologia típica. Barras: 1µm.

Após 24h de infecção, o tratamento com rapamicina induziu aumento no número de CLs (Figuras 4.12A-B) em macrófagos, comparado às 6 horas iniciais. Estas organelas mostraram-se electrón-lúcidas e frequentemente associadas com perfis de retículo endoplasmático (Figuras 4.12A-B), além de estruturas membranares concêntricas dispersas pelo citosol (Figura 4.12C) e autofagossomos contendo grande quantidade de material degradado (Figura 4.12D).

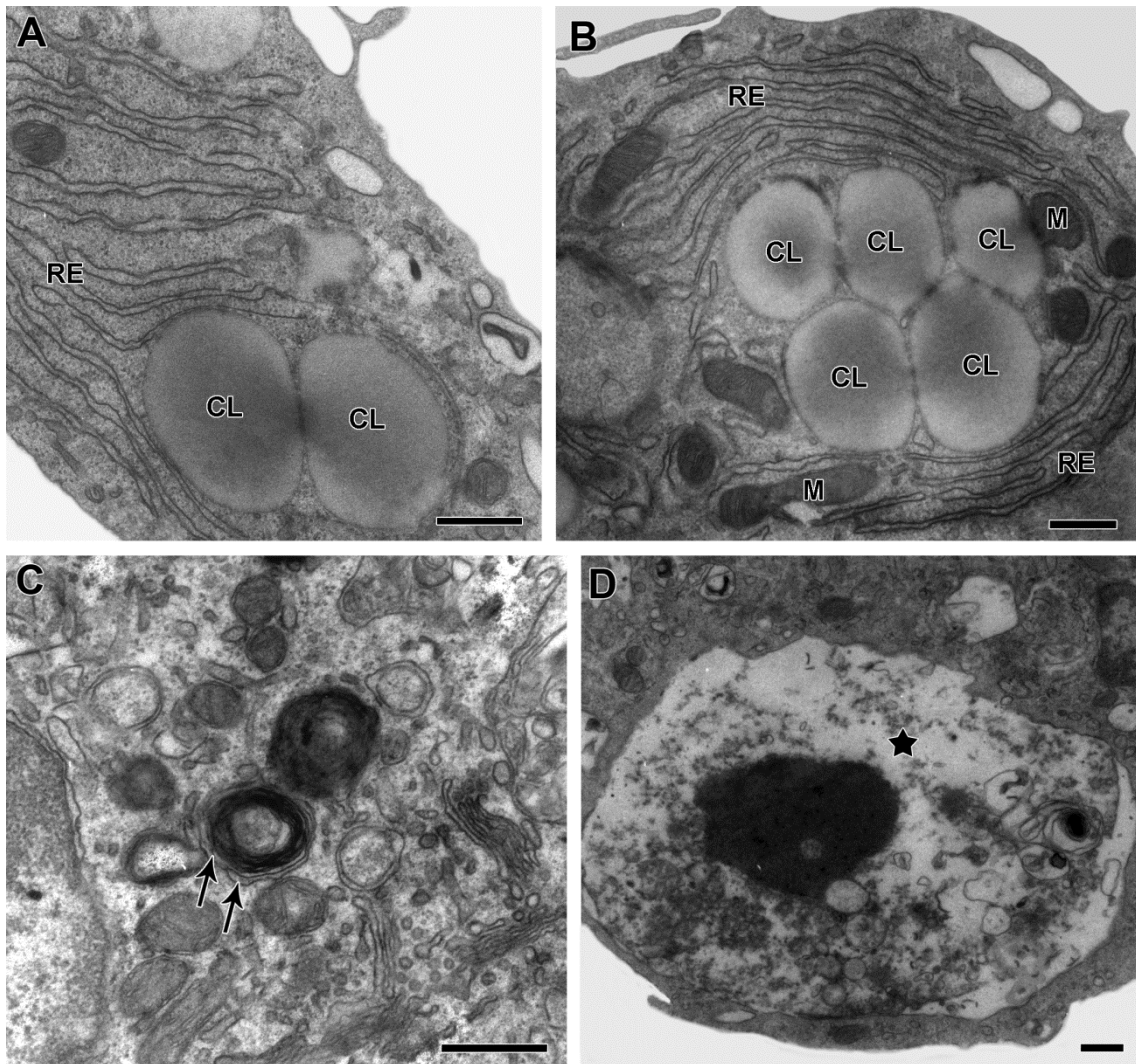


Figura 4.12. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-tratados com rapamicina, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. (A,B) Inúmeros corpúsculos lipídicos (CL) circundados por retículo endoplasmático (RE) e mitocôndrias (M) foram observados em macrófagos tratados. (C,D) Rapamicina também induziu o aparecimento de estruturas membranares concêntricas (setas) e autofagossomo (estrela). Barras: 0,5 μ m.

Apos 24hs de infecção, um grande número de macrófagos incubados em DMEM^{-/-} apresentaram autofagossomos (Figuras 4.13A-D) e em algumas células, estruturas membranares concêntricas também foram observadas (Figura 4.13D).

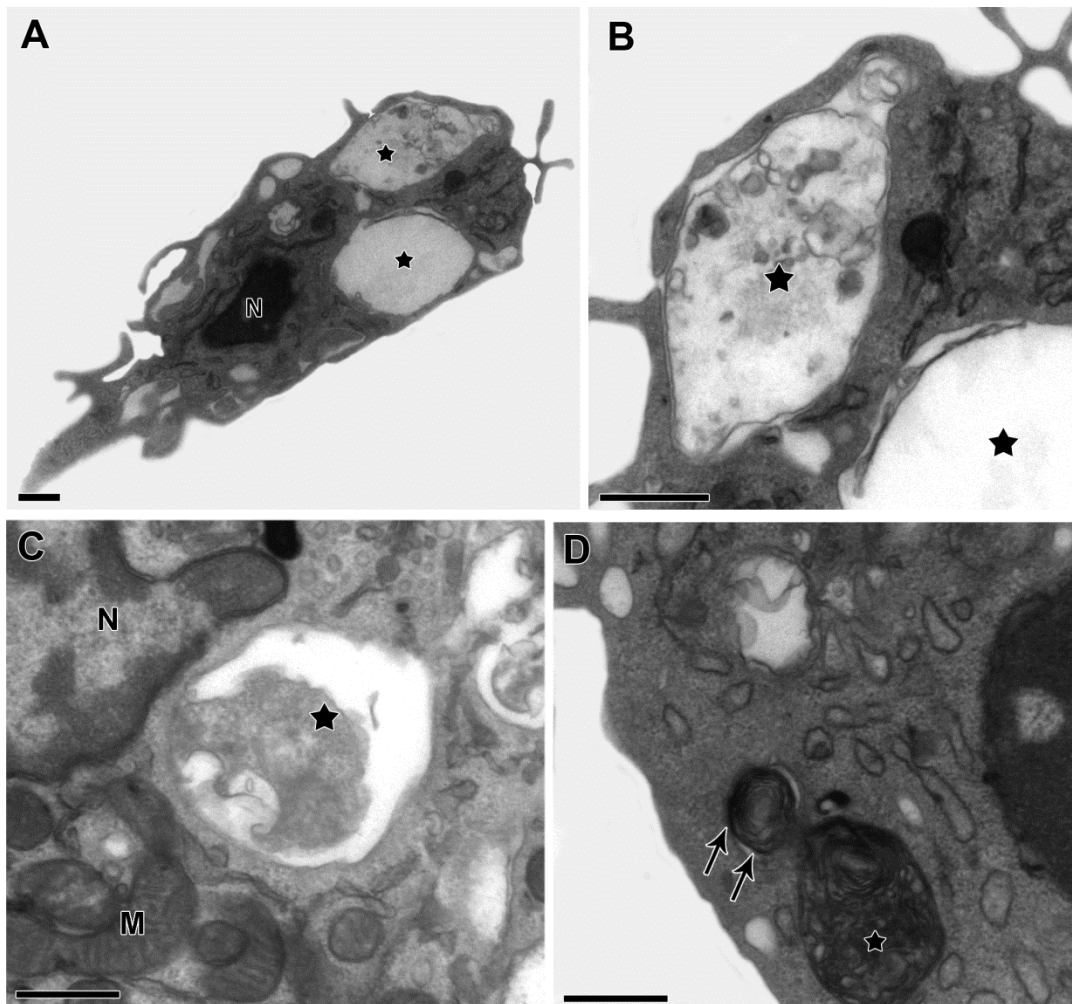


Figura 4.13. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos peritoneais pré-incubados em DMEM^{-/-}, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. **(A)** Visão geral de um macrófago sob estresse nutricional, apresentando autofagossomos (estrelas pretas). **(B-D)** Detalhe das diferentes etapas de degradação observadas no interior de autofagossomos (estrelas), além da formação de estruturas membranares concêntricas (setas). N: núcleo e M: mitocôndria. Barras: 0,5 μ m.

A análise ultraestrutural foi também realizada em células cardíacas pré-incubadas com rapamicina e DMEM^{-/-} e infectadas por 24h e 48h. No tempo de 24h, células controle apresentaram morfologia típica, contendo inúmeras formas tripomastigotas com aspecto característico do parasito (Figuras 4.14A-D). Neste tempo inicial, o tratamento com rapamicina não promoveu alterações morfológicas no parasito (Figura 4.15A). Entretanto, as células tratadas exibiram um grande número de autofagossomos, além de perfis concêntricos de membranas no citosol (Figuras 4.15B-D, 4.16A-E). Apesar da maior parte das mitocôndrias observadas não terem apresentado alterações morfológicas, algumas destas organelas exibiram uma completa desorganização das suas cristas (Figura 4.16F). Ainda no tempo de 24h, a incubação em DMEM^{-/-} também não levou a alterações ultraestruturais nos parasitos (Figura 4.17A). Assim como no tratamento com rapamicina, raras mitocôndrias apresentaram alterações morfológicas como inchaço e perda de cristas após o estresse nutricional, algumas podendo conter estruturas membranares em seu interior (Figura 4.17B). DMEM^{-/-} ainda induziu a formação de inúmeros autofagossomos, apresentando diferentes níveis de degradação em seu interior (Figura 4.17C), além do surgimento de estruturas membranares concêntricas dispersas por todo o citosol (Figuras 4.18A-D).

A análise de células cardíacas controle no tempo de 48h apontou a presença de *T. cruzi* com morfologia normal (Figuras 4.19A-D), estando alguns em estágio de transição entre tripomastigotas e amastigotas (Figura 4.19C), e outros já completaram sua diferenciação para a forma proliferativa intracelular (Figuras 4.19A,B). Assim como observado em macrófagos controle, células cardíacas também apresentaram estruturas membranares concêntricas no citosol, além de autofagossomos e perfis de retículo endoplasmático envolvendo organelas como mitocôndrias (Figuras 4.19E-F). Em 48h, rapamicina exacerbou a formação de autofagossomos (Figuras 4.20A-D, 4.21B,D), podendo conter membranas concêntricas em seu interior (Figuras 4.20C, 4.21B). O tratamento com a droga ainda levou ao aparecimento de estruturas membranares concêntricas no citosol (Figuras 4.20A, 4.21A,C,D), sendo a fusão destas estruturas com autofagossomos também detectada (Figura 4.20B). Ainda em 48h, algumas células cardíacas pré-incubadas com DMEM^{-/-} ainda apresentavam amastigotas com morfologia típica (Figura 4.22A).

O estresse nutricional também induziu a formação de autofagossomos (Figura 4.22B), além de levar a um esvaziamento do citoplasma, observado através da perda de sua eletrondensidade (Figura 4.22C). A maioria das mitocôndrias bem como os sarcômeros apresentaram morfologia típica (Figuras 4.22C,D), sendo que apenas raras mitocôndrias estavam alteradas (Figura 4.22D).

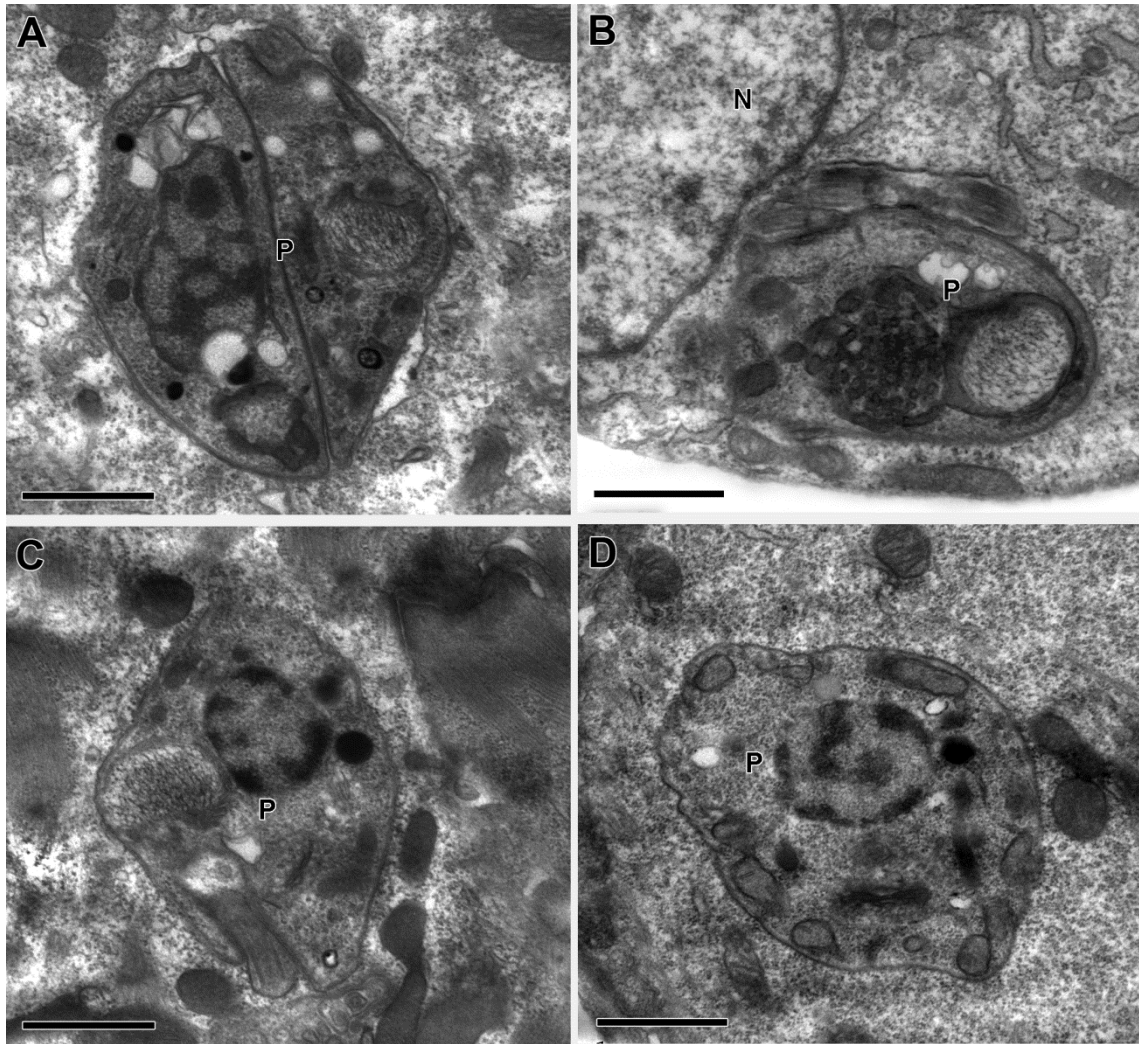


Figura 4.14. Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. Formas tripomastigotas do parasito (P) apresentando morfologia típica. N: núcleo. Barras: 1µm.

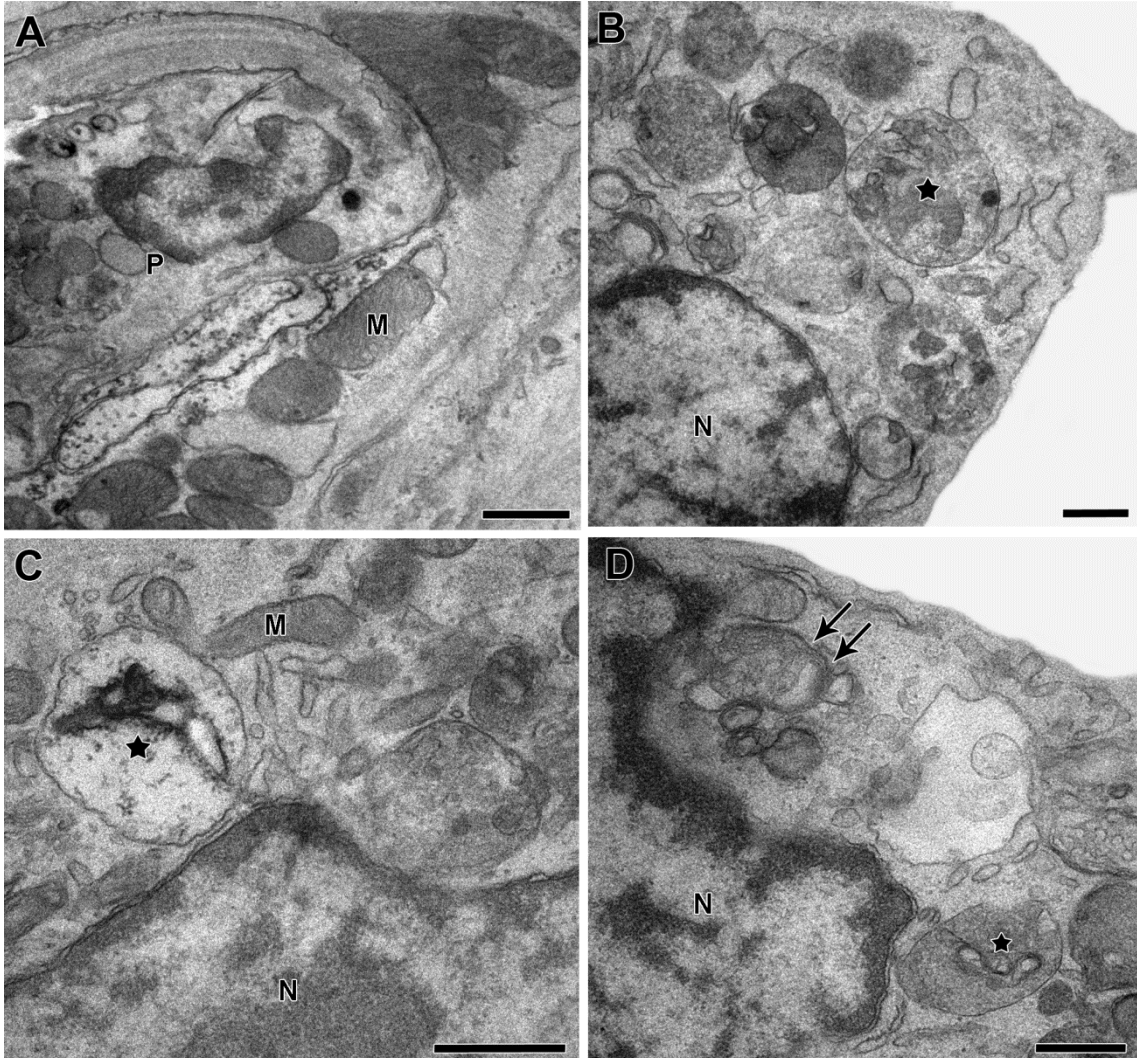


Figura 4.15. (A-D) Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-tratadas com rapamicina, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. (A) Tripomastigota intracelular (P) apresentando morfologia típica. (B-D) Autofagossomos (estrelas) em diferentes estágios de degradação podem ser observados além de estruturas membranares concêntricas (setas pretas). N: núcleo; M: mitocôndria. Barras: 0,5 μ m.

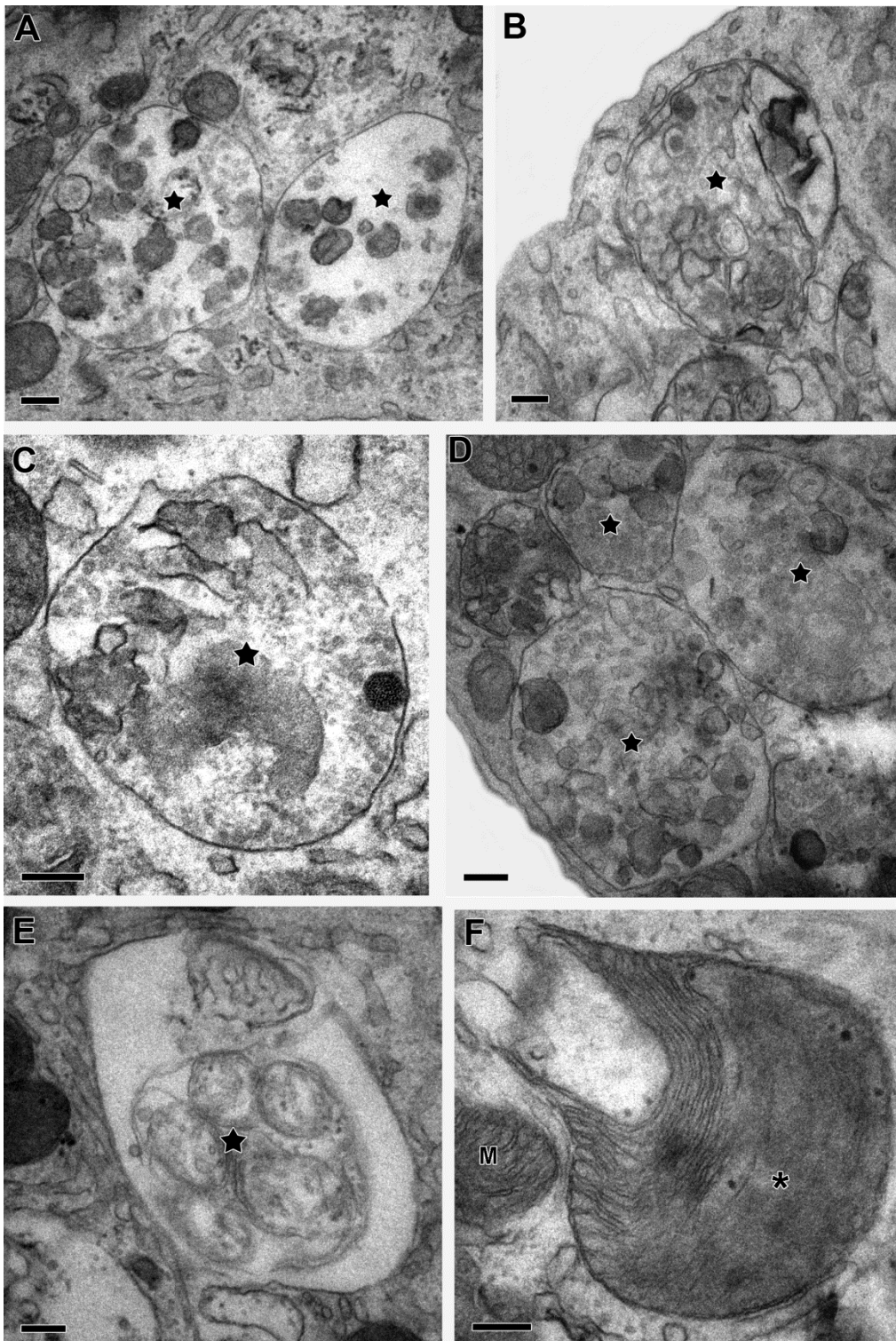


Figura 4.16. Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-tratadas com rapamicina, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. (A-E) O tratamento induziu o aparecimento de autofagossomos (estrelas) apresentando diversos graus de degradação. (F) Rapamicina também induziu alteração na morfologia das cristas mitocondriais (asterisco). Barras: 0,2 μ m.

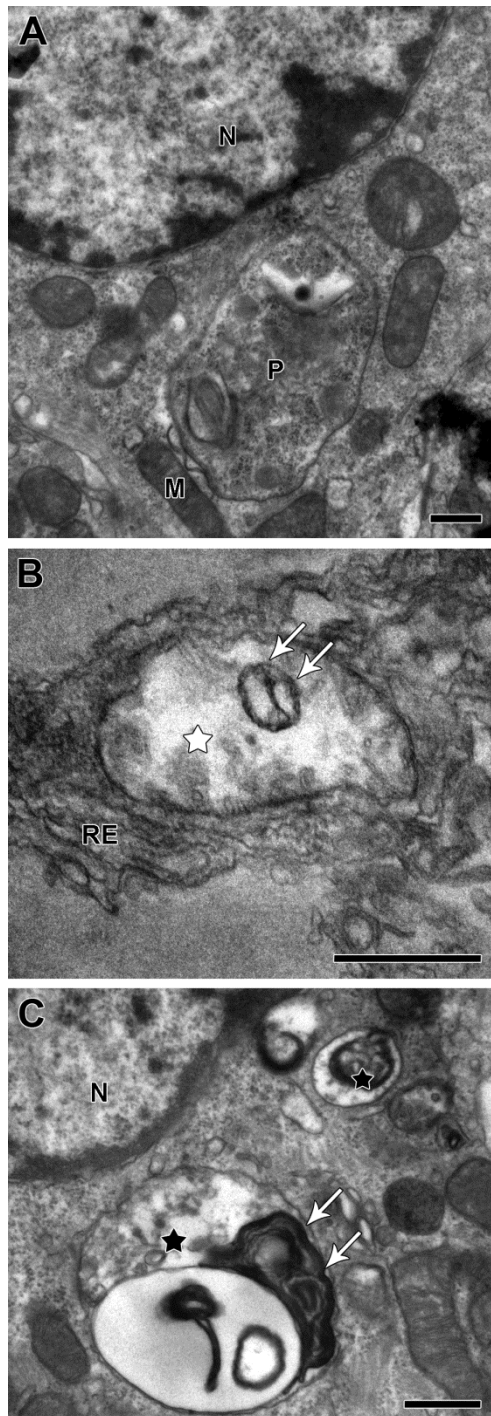


Figura 4.17. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-incubadas em $DMEM^{-/}$, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. **(A)** Parasito intracelular (P) apresentando morfologia normal. **(B)** A indução de estresse nutricional levou a alteração na mitocôndria (estrela branca) da célula hospedeira, apresentando estruturas membranares concêntricas no interior da organela (setas brancas). **(C)** A incubação em $DMEM^{-/}$ ainda levou a formação de autofagossomos (estrelas pretas) apresentando estruturas membranares concêntricas (setas brancas). N: núcleo; RE: retículo endoplasmático; M: mitocôndria. Barras: 0,5 μ m.

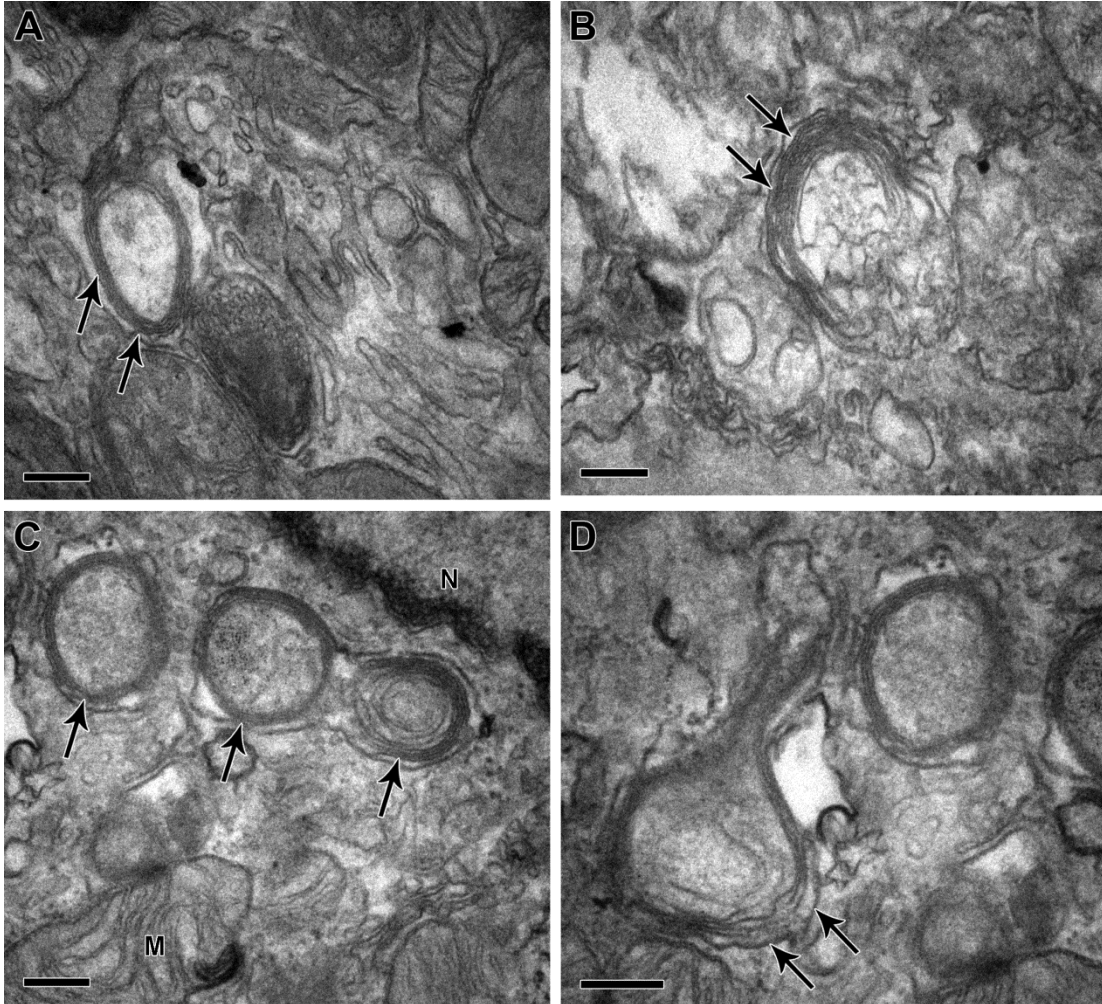


Figura 4.18. Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-incubadas em DMEM^{-/-}, 24h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. (A-D) A indução de estresse nutricional levou ao aparecimento de estruturas membranares concêntricas (setas) no citosol. M: mitocôndria. Barras: 0,2 μ m.

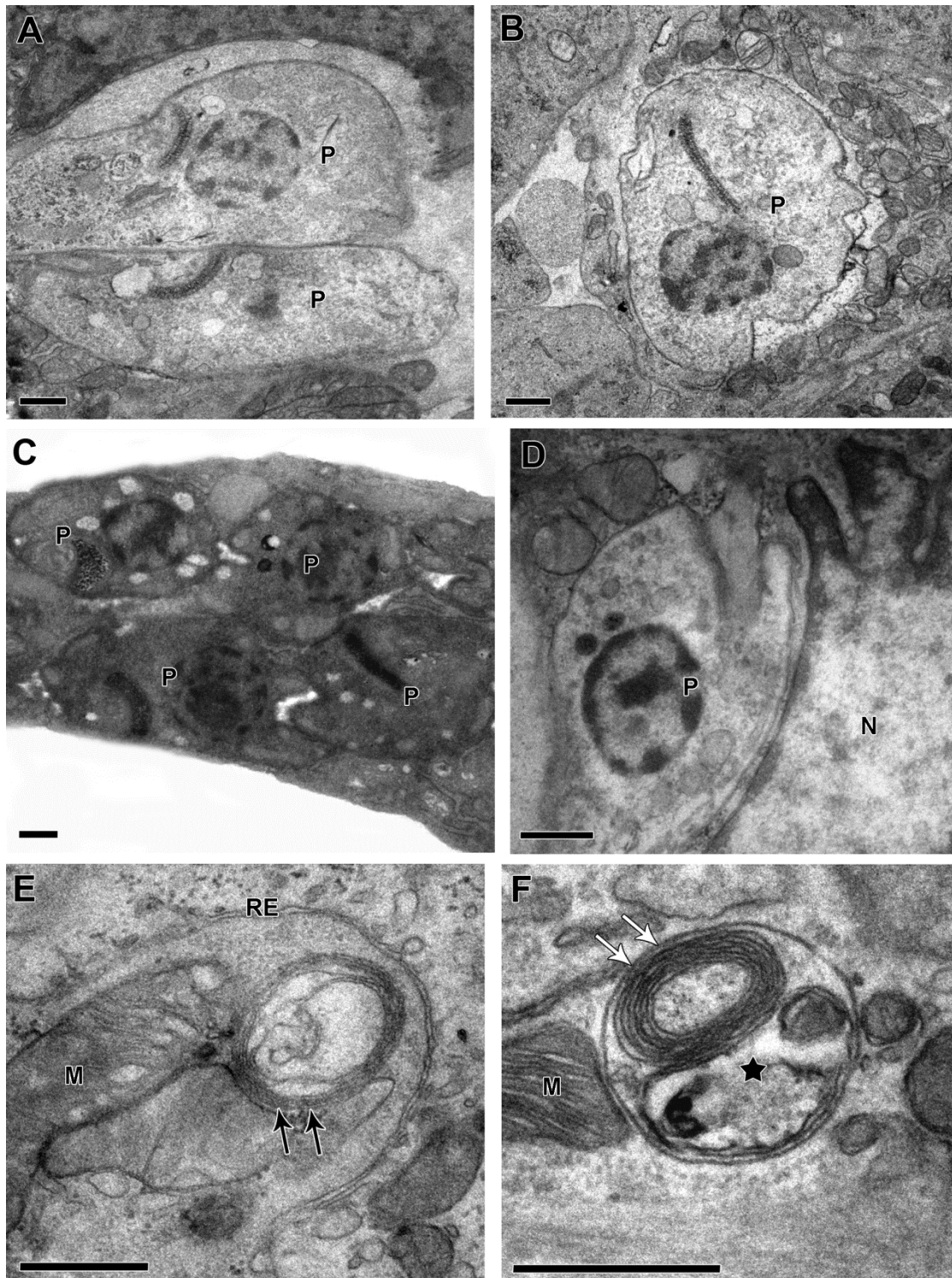


Figura 4.19. Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas 48h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. (A-D) Formas amastigotas do parasito (P) apresentando morfologia característica. (E) Presença de perfis de retículo endoplasmático (RE) envolvendo mitocôndrias (M) e estruturas membranares concêntricas (setas pretas). (F) Em detalhe, o contato íntimo da mitocôndria (M) com um autofagossomo (estrela preta) contendo estruturas membranares concêntricas em seu interior (setas brancas). N: núcleo. Barras: 0,4 μ m.

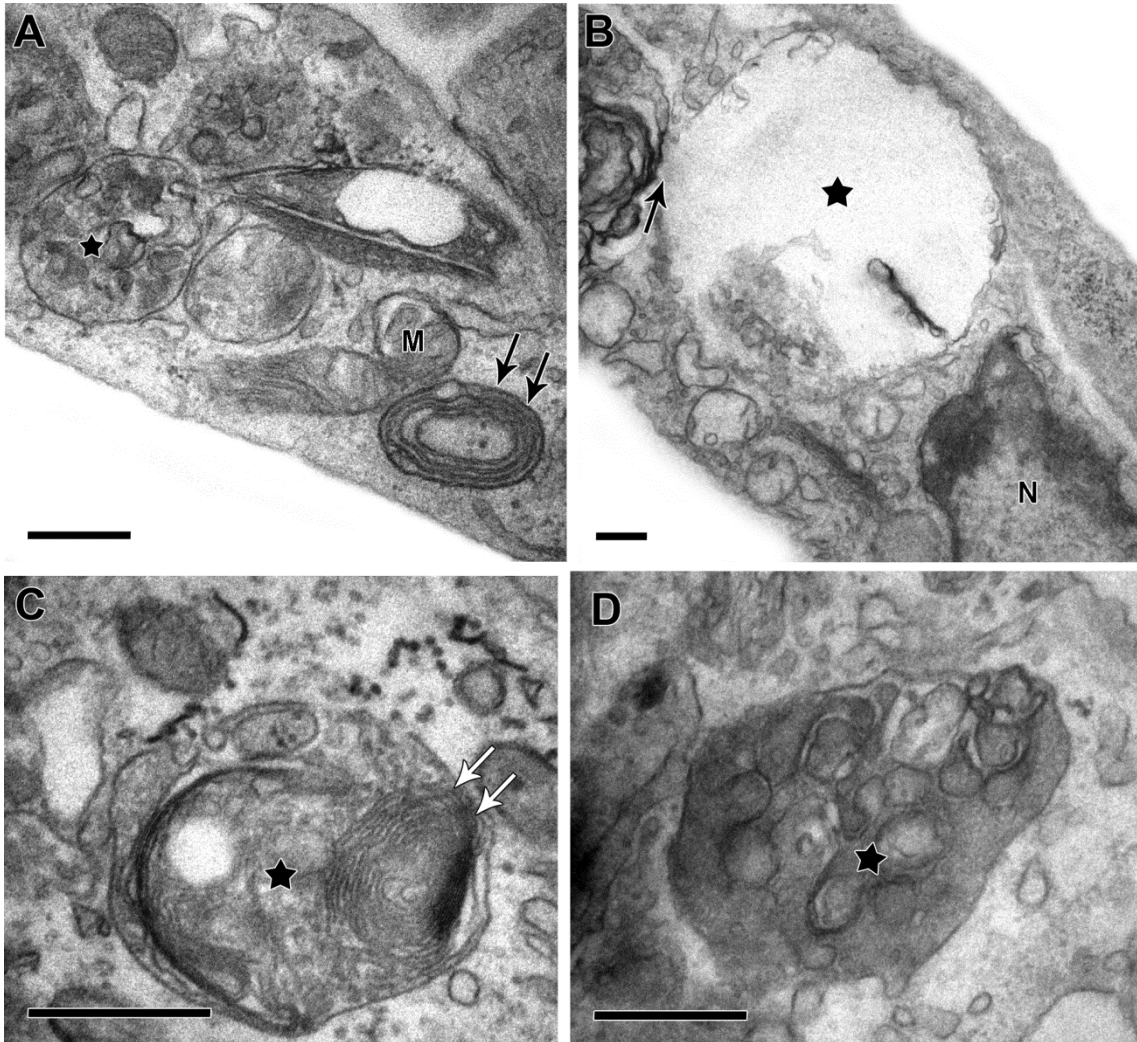


Figura 4.20. Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-tratadas com rapamicina, 48h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. (A-D) Rapamicina induziu a formação de estruturas membranares concêntricas (setas pretas) no citosol, além de autofagossomos (estrelas pretas) podendo conter estruturas membranares concêntricas em seu interior (setas brancas). N: núcleo. Barras: 0,4 μ m.

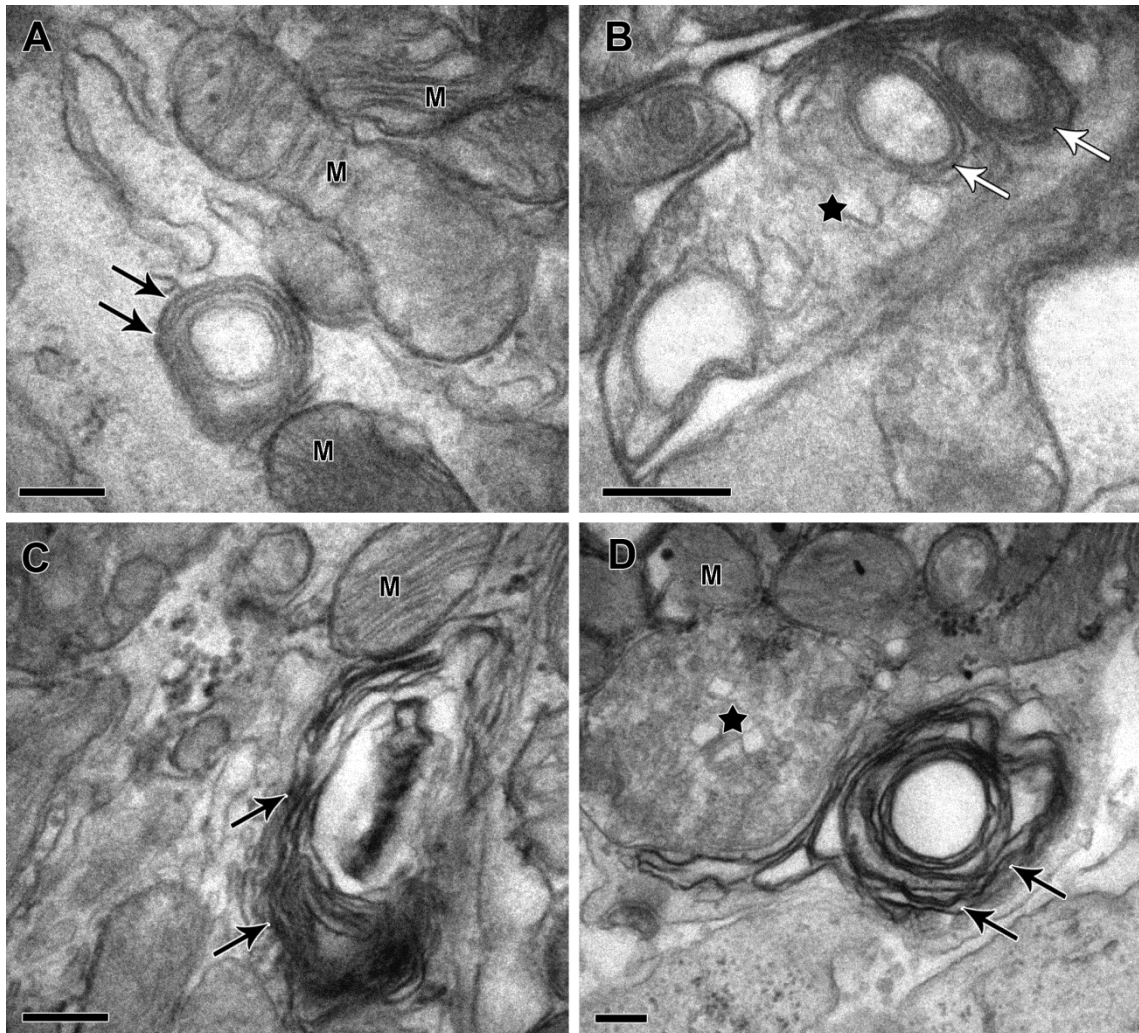


Figura 4.21. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-tratadas com rapamicina, 48h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. (A-D) O tratamento induziu o aparecimento de estruturas membranares concêntricas (setas pretas) e autofagossomos (estrelas pretas), podendo conter estruturas membranares concêntricas em seu interior (setas brancas). M: mitocôndria. Barras: 0,2 μ m.

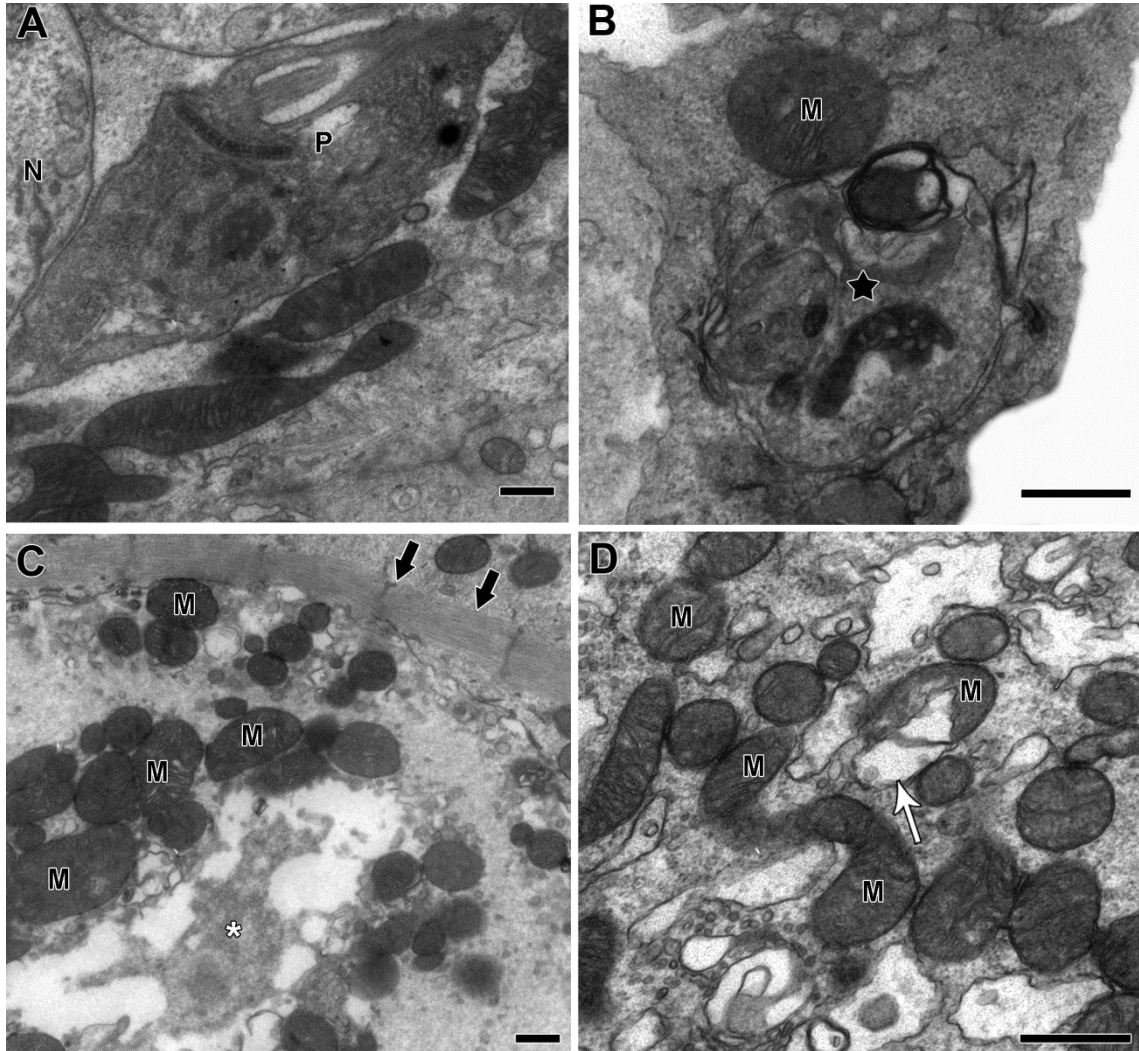


Figura 4.22. Microscopia eletrônica de transmissão de células cardíacas pré-incubadas em DMEM^{-/-}, 48h após a infecção com *Trypanosoma cruzi*. **(A)** Forma amastigota intracelular do parasito (P) não apresentando alteração em sua morfologia. **(B)** Detalhe de um autofagossomo (estrela preta) próximo a uma mitocôndria (M). **(C,D)** A indução de estresse nutricional leva a uma vacuolização citoplasmática (asterisco branco). Os sarcômeros (setas largas pretas) e as mitocôndrias (M) em sua maioria exibem sua morfologia preservada. Raras mitocôndrias apresentaram estruturas membranares concêntricas (setas brancas) em seu interior. Barras: 0,5 μ m.

4.4. Análise quantitativa de CLs após a indução de autofagia em macrófagos e células cardíacas infectadas por *T. cruzi*

A quantificação de CLs foi realizada em macrófagos e células cardíacas após o tratamento com a rapamicina e a incubação em DMEM^{-/-} seguindo o desenho experimental da indução de autofagia pré-infecção.

Nas primeiras 6h de infecção, ambos os indutores de autofagia reduziram significativamente o número de CLs por macrófago, representando uma inibição de 36 e 20% nos grupos rapamicina e DMEM^{-/-}, respectivamente. Em 24h de infecção a quantidade de CLs aumentou, com relação ao tempo inferior, contudo não houve diferença entre células apenas infectadas e células submetidas à indução de autofagia (Figura 4.23A).

A análise quantitativa de CLs em células cardíacas apontou um número cerca de 5x menor ao observado em macrófagos, quando comparamos células controle. Em 24h, não houve diferenças significativas entre os grupos estudados, sendo em 48h detectada uma redução de em torno de 35% no número de CLs por células cardíacas apenas em células incubadas com DMEM^{-/-}. O tratamento com rapamicina no mesmo tempo levou a uma tendência de diminuição embora não significativa (Figura 4.23B).

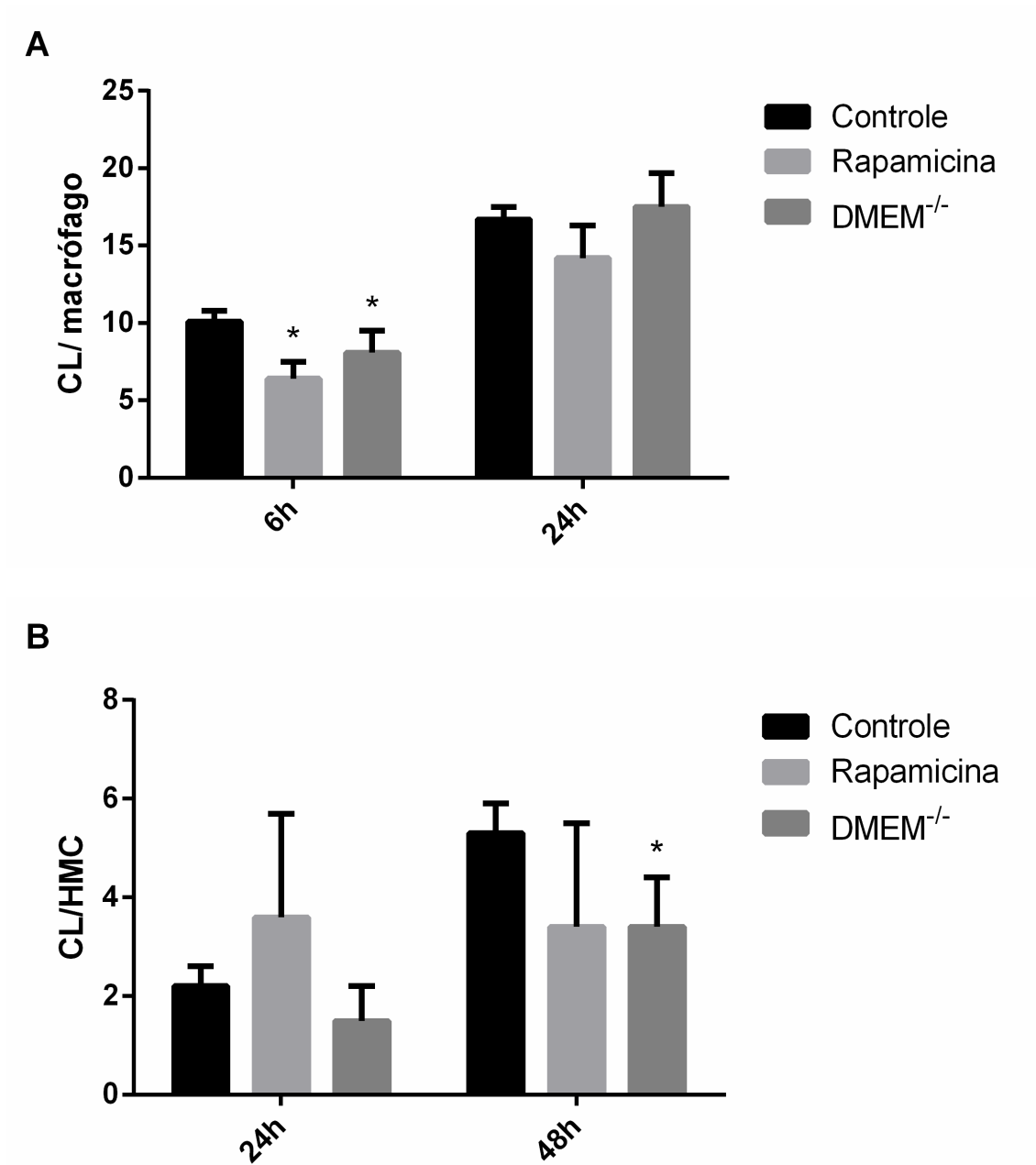


Figura 4.23. Análise do número de CLs após a indução de autofagia pré-infecção por *Trypanosoma cruzi*. **(A)** macrófagos; **(B)** células cardíacas (* $p \leq 0,05$).

4.5. Análise da expressão e localização da proteína LC3 após a indução de autofagia em macrófagos e células cardíacas infectadas por *T. cruzi*

O efeito do tratamento com a rapamicina e da incubação em DMEM^{-/-} na expressão e localização de LC3 foi analisado em macrófagos e células cardíacas nos diferentes tempos estudados por imunofluorescência utilizando o desenho experimental da indução de autofagia pré-infecção.

Após 6h de infecção, em torno de 25% dos macrófagos controles apenas infectados apresentaram marcação para LC3, sendo esta percentagem aumentada significativamente após a indução de autofagia para cerca de 65% e 51% nos grupos rapamicina e DMEM^{-/-}, respectivamente. Após 24h de infecção, os percentuais de macrófagos marcados para LC3 se mantiveram, sendo o aumento em relação ao controle ainda observado para DMEM^{-/-} e uma tendência de aumento para rapamicina (Figura 4.24A). A análise da associação da proteína LC3 ao parasito após 6h de infecção apontou que células sob estímulos autofágicos apresentavam um aumento de cerca de 4x a marcação de LC3 associada ao parasito, aumento este não observado no tempo 24h (Figura 4.24B).

Células cardíacas apresentaram um perfil distinto de marcação para LC3 em relação aos macrófagos. No tempo de 24h após infecção, não foram observadas diferenças entre nenhum dos grupos nos parâmetros avaliados de percentagem de células marcadas para LC3 e associação parasito-proteína LC3. Entretanto em 48h, um acentuado aumento na marcação foi observado nas células cuja autofagia foi induzida, chegando a 68% e 57% nos grupos rapamicina e DMEM^{-/-}, respectivamente (Figuras 4.25A,B). Este aumento expressivo também foi observado no parâmetro de associação parasito-LC3, onde a associação foi cerca de 10x maior em células pré-incubadas com os indutores autofágicos (Figuras 4.25A,B).

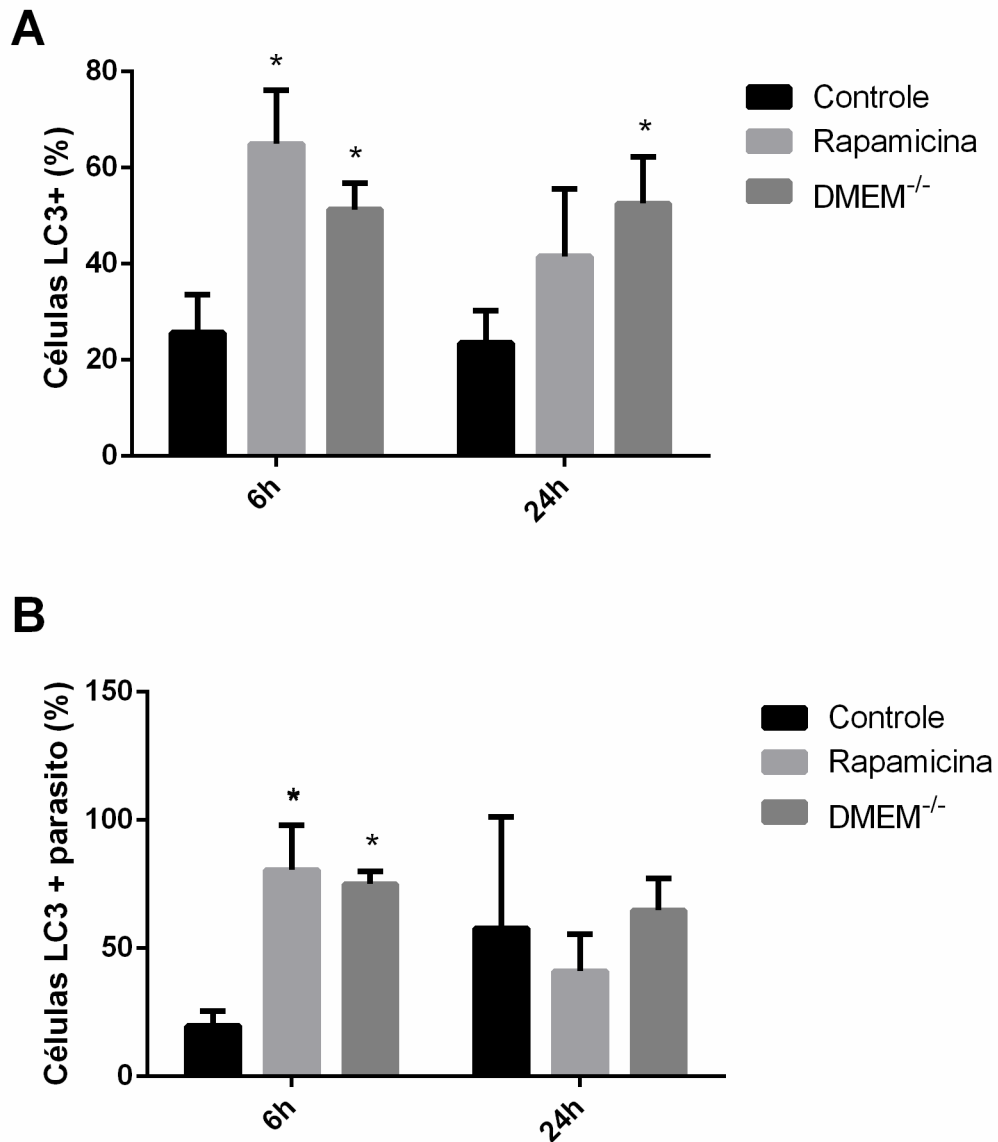


Figura 4.24. Análise por imunofluorescência da localização da proteína LC3 após a indução de autofagia pós-infecção por *Trypanosoma cruzi* em macrófagos. **(A)** % células LC3+; **(B)** % células LC3+ e parasitos associados (* $p \leq 0,05$).

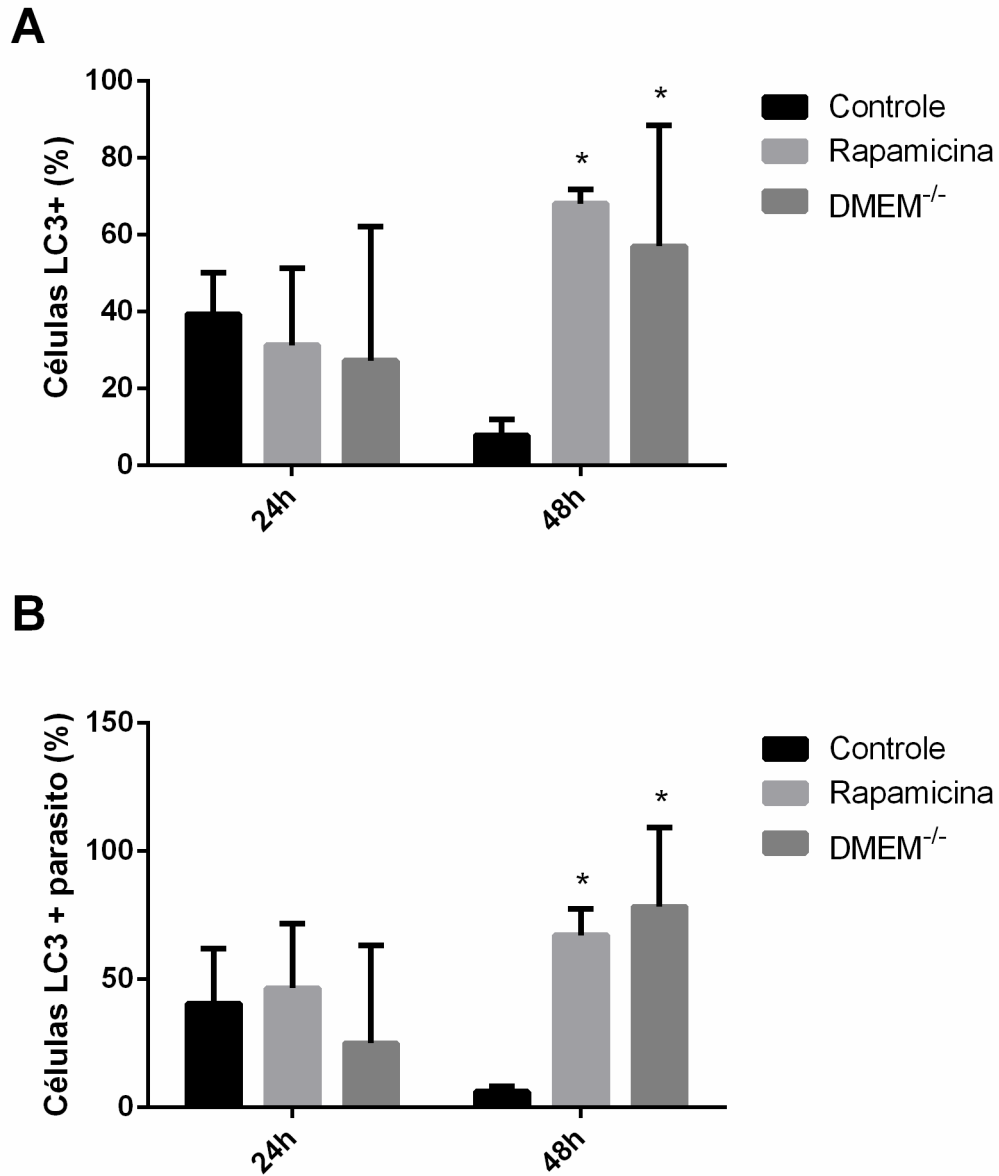


Figura 4.25. Análise por imunofluorescência da localização da proteína LC3 após a indução de autofagia pós-infecção por *Trypanosoma cruzi* em células cardíacas. **(A)** % células LC3+; **(B)** % células LC3+ e parasitos associados (* $p \leq 0,05$).

Por microscopia eletrônica de transmissão, foram ainda realizados ensaios de imunomarcção de LC3A, através da técnica de *immunogold*, que confirmaram a presença e especificidade desta proteína autofagossomal em células cardíacas infectadas por *T. cruzi* no tempo de 48h (Figuras 4.27A,B). Uma maior marcação para LC3 foi claramente observada na célula infectada, associada com vacúolos citoplasmáticos e também distribuída no citosol. Na célula não-infectada, a marcação foi menos abundante e dispersa pelo citosol (Figura 4.26C). No Grupo controle do anticorpo, células cardíacas infectadas que tiveram o anticorpo primário substituído por um anticorpo irrelevante mostraram imunomarcção negativa (Figura 4.26D).

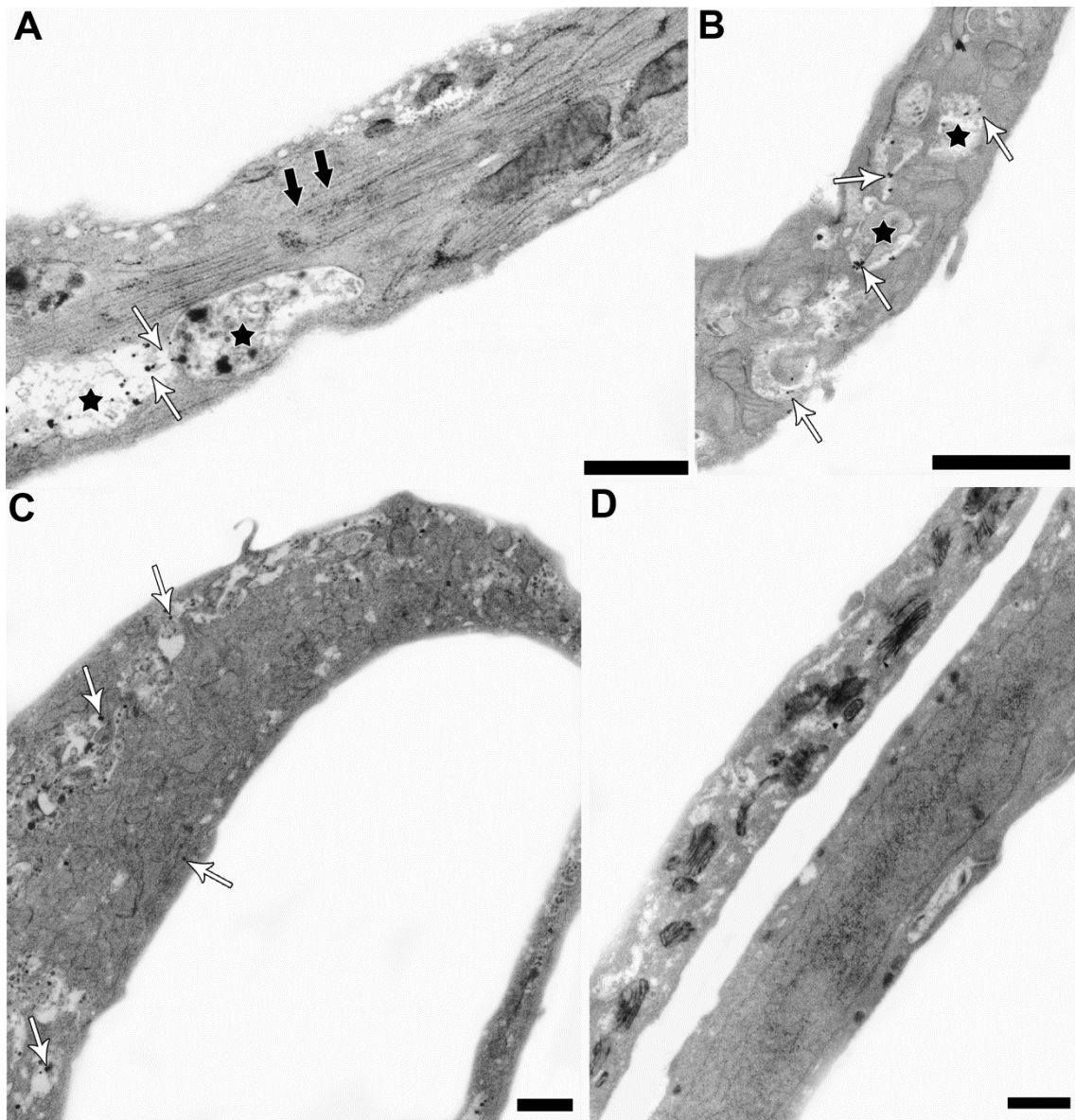


Figura 4.26. Imunomarcção de LC3 por microscopia eletrônica de transmissão em células cardíacas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*. (A,B) Células após 48h de infecção. Autofagossomos (estrelas pretas) mostram-se positivos para LC3 (setas brancas indicam partículas de ouro). As setas pretas indicam a estrutura sarcomérica. (C) Células não-infectadas demonstram menor presença de LC3. (D) Células infectadas marcadas com IgG, demonstrado especificidade do anticorpo usado. Barras: 0,5 μ m.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o processo de autofagia vem recebendo considerável atenção na literatura. A autofagia representa não apenas mais um tipo de morte celular programada, mas também um mecanismo atuante na regulação da homeostase celular (revisto em Klionsky, 2007; Mizushima et al., 2011a;b; Cuervo et al., 2012). Além disso, a via autofágica parece ter um papel importante durante a interação patógeno-célula hospedeira, favorecendo ou dificultando a infecção. Em 2009, a participação da autofagia foi demonstrada pela primeira vez durante a infecção com *T. cruzi* em modelos de linhagens celulares (Romano et al., 2009). O presente trabalho representa o primeiro estudo sobre o papel da autofagia durante a infecção de células de cultura primária (macrófagos e células musculares) por este parasito.

A análise da indução da autofagia por fármaco (rapamicina) e por déficit nutricional (DMEM^{-/-}) anterior à infecção levou, de maneira geral, a uma redução na infecção nos dois tipos celulares avaliados (Figuras 4.1A e 4.2A). Esta diminuição foi observada a partir de 6h de infecção em macrófagos, e a partir de 24h em células do músculo cardíaco. Esses resultados sugerem a participação da via autofágica como mecanismo de eliminação do parasito após o estabelecimento da infecção em ambos os tipos celulares. Embora a incubação em DMEM^{-/-} tenha levado a um aumento da infecção inicialmente (18h), este percentual se manteve constante em tempos maiores, enquanto células controle apresentaram uma maior infecção em tempos tardios (Figura 4.2A).

O parâmetro parasitos/100 células também foi reduzido nos mesmos tempos avaliados em ambas as células tratadas com rapamicina ou incubadas em DMEM^{-/-}, indicando que a replicação intracelular dos parasitos sob estas condições experimentais foi impedida, seja por uma menor replicação e/ou destruição de parasitos (Figuras 4.1B e 4.2B). Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores, os quais demonstraram, em células Hela incubadas com indutores autofágicos, um número de parasitos por 100 células inferior ao do grupo controle (Martins et al., 2011; Maeda et al., 2011,2012).

O papel de citocinas na resistência à infecção chagásica encontra-se bem documentado. Por exemplo, o IFN- γ atua na redução da replicação de amastigotas tanto *in vitro* como *in vivo* (Reed et al., 1988; Silva et al., 1992; Rodrigues et al., 2012), além de participar também na indução do processo autofágico (Zhao et al., 2007, 2009; Pinheiro et al., 2009; Mizushima et al., 2011a; Matsuzawa et al., 2012). Nossos resultados juntamente com esses dados da literatura reforçam a hipótese da participação da autofagia previamente induzida na célula hospedeira como mecanismo de resistência à infecção.

Entretanto, quando avaliamos o efeito de rapamicina e DMEM^{-/-} após a infecção, temos duas situações. Macrófagos incubados com os indutores autofágicos imediatamente após o tempo de interação (24h) ou após o estabelecimento da infecção (48h) não apresentaram diferenças em relação ao controle, sugerindo que a indução não foi suficiente para reduzir a infecção e proliferação dos parasitos em 24h de estímulo (Figura 4.3). Apenas uma discreta redução na infecção de macrófagos tratados com rapamicina foi observada em 48h, incapaz de alterar a taxa endocítica nessa condição. Interessantemente, em células musculares a incubação com rapamicina ou DMEM^{-/-} após a infecção, levou a um importante decréscimo no percentual de infecção e no número de parasitos por 100 células. A diminuição mais acentuada pôde ser observada após o estabelecimento da infecção (72h), onde os dois estímulos autofágicos foram capazes de reduzir a infecção e a taxa endocítica. Esta importante redução reforça que a autofagia impede a proliferação maciça dos parasitos que ocorre após 48h nessa célula fagocítica não profissional. Romano e colaboradores (2009) observaram que, ao incubar com meio de estresse nutricional ou rapamicina, após o estabelecimento da infecção em células CHO, não houve alteração da proporção de amastigotas por célula, semelhante ao nosso resultado obtido com macrófagos. Este achado sugere que a participação da autofagia pós-infecção depende diretamente do tempo pelo qual a célula é estimulada bem como do tipo celular avaliado e suas características dentre as quais podemos destacar a sua capacidade fagocítica.

Como outra abordagem para o estudo da autofagia, muitos grupos utilizam a inibição farmacológica da via através do emprego de inibidores de PI3K como 3-metiladenina (3-MA), wortmanina ou LY294002 (Eskelinen et al., 2005; Romano et al., 2009; Pinheiro et al., 2009; Martins et al., 2011-). Entretanto, devido à baixa especificidade dessas drogas que inibem PI3K de classe I e III, associada ao fato que essas enzimas participam de inúmeras vias de sinalização celular (Petiot et al, 2000; revisto em Klionsky, 2007), abordagens moleculares como o uso de RNA de interferência para proteínas autofágicas como Atg5, beclina-1 ou LC3 devem ser utilizadas para confirmação da hipótese observada (revisto em Klionsky et al, 2008; 2012), sendo uma das perspectivas desta Dissertação.

Visando uma melhor caracterização morfológica da autofagia nos modelos celulares estudados, foi empregada a microscopia eletrônica de transmissão de células estimuladas antes da infecção. As análises ultraestruturais de macrófagos e células musculares controles, apenas infectadas, apontaram a ocorrência de autofagia nestas células, a partir da identificação de estruturas citoplasmáticas típicas da via autofágica, principalmente autofagossomos (Figuras 4.5D e 4.19E,F). Em células previamente incubadas com rapamicina ou DMEM¹ ocorreu aumento evidente na proporção de autofagossomos (Figuras 4.7; 4.9C,D; 4.16A-E e 4.17B,D) e outras estruturas indicativas de autofagia, como estruturas formadas por membranas concêntricas (figuras 4.6C; 4.9C; 4.12C; 4.15D; 4.18C,D e 4.21).

As análises ultraestruturais revelaram que, de maneira geral, as células não apresentaram alterações estruturais drásticas. Determinados tratamentos, no entanto, levaram a alterações em algumas organelas. Em macrófagos, apenas o grupo incubado com rapamicina por 6h de infecção apresentou alteração na conformação do Golgi, o qual mostrou características de desestruturação (Figura 4.6D). Em outros modelos celulares, já foi demonstrada a desorganização das cisternas do Golgi mediante indução autofágica, indicando, a depender da severidade, um perfil de morte autofágica ou mesmo a fissão da organela para a formação de autofagossomos (Takahashi et al., 2011; Fernandes et al., 2012; Veiga-Santos et al., 2012). A Figura 4.6C sugere fortemente o Golgi como fonte da PAS devido a sua

proximidade com membranas concêntricas em macrófagos tratados com rapamicina, uma vez que a presença de Atg9 e Atg1 já foi detectada na organela (Naydenov et al., 2012; Yamamoto et al., 2012).

Em células musculares do coração, a incubação tanto com rapamicina quanto com DMEM^{-/-} induziu danos morfológicos em mitocôndrias (Figuras 4.16F, 4.17B e 4.22D). Entretanto, estas alterações não foram frequentes, tendo sido observado mitocôndrias com morfologia normal ao lado de mitocôndrias alteradas. Estas alterações mitocondriais já foram descritas em células cardíacas submetidas à isquemia e reperfusão, condições nas quais já foi demonstrada a importância da autofagia (French et al., 2010). A remoção eficiente de mitocôndrias senescentes ou danificadas pela autofagia impede a produção excessiva de ROS e liberação de componentes que poderiam desencadear a morte celular (Gottlieb & Mentzer, 2010). Sendo assim, é possível que as mitocôndrias das células cardíacas em nossas condições experimentais estejam sendo direcionadas para um processo de mitofagia (autofagia de mitocôndrias), sugerido pela presença de membranas concêntricas no interior da organela, além da sua proximidade e associação a autofagossomos (Figuras 4.17B e 4.21C,D). Também foi observado, após a incubação em DMEM^{-/-} por 48h, um rarefação citoplasmática (Figura 4.22C), característica esta anteriormente descrita em situações de disfunções cardíacas (Kuruvilla et al., 2004; Matsushita et al., 2005). Em linhas gerais, nossos dados apontam que a indução por longos tempos da autofagia em células musculares do coração acarreta danos mais extensos semelhantes aos observados em condições patológicas não infecciosas.

Conforme esperado, a autofagia foi claramente caracterizada ultraestruturalmente nos dois tipos celulares avaliados sob estímulo de rapamicina ou meio de estresse nutricional. Inúmeros autofagossomos, morfológicamente típicos, foram detectados contendo material nos mais diversos estágios de degradação. A presença de autofagossomos iniciais com conteúdo elétron-denso e pouco material degradado (Figuras 4.7B e 4.12D), juntamente com a detecção de autofagossomos tardios, com baixa elétron-densidade apresentando apenas membranas residuais em seu interior (Figuras

4.9B-D e 4.16A-E), confirmam a ocorrência efetiva e progressão da via autofágica nos modelos estudados.

Outras características ultraestruturais frequentes, observadas tanto em macrófagos como em células musculares do coração sob estímulos autofágicos foram a presença de estruturas membranares, caracterizadas por arranjo de membranas concêntricas e perfis de retículo endoplasmático envolvendo estruturas subcelulares. Estes se encontravam intimamente associados aos autofagossomos (Figuras 4.13D, 4.17C e 4.21). Moléculas como o PI3P e outros fosfolipídios, Atg1, WIPIs presentes no retículo endoplasmático, auxiliam na formação da membrana que originará a PAS (Hayashi-Nishino et al., 2009; Yla-Anttila et al., 2009; Mizushima et al., 2011a). Na literatura ainda não há um consenso quanto à origem das membranas que formam o pré-autofagossomo. Dependendo da indução autofágica é relatado o retículo endoplasmático, o Golgi ou ainda a mitocôndria como organelas doadoras de membrana iniciadora do pré-autofagossomo (Chen et al., 2012; Longatti et al., 2012).

Trabalhos anteriores já descreveram a ultraestrutura do *T. cruzi* (cepa Y) após infecção tanto em macrófagos quanto em células cardíacas de cultura primária (Meirelles et al. 1982;1986; Araújo-Jorge et al., 1992; Soeiro et al., 2002; de Souza et al., 2003, Barrias et al., 2007). Interessantemente, os parasitos internalizados em células controle apenas infectadas ou sob estímulo autofágico apresentaram morfologia normal, sem alterações ultraestruturais características de autofagia (Figuras 4.5A, 4.10C,D, 4.11A,B, 4.15A-D, 4.17A, 4.19A-D e 4.22A), reforçando que o efeito da indução de autofagia utilizada atua diretamente na célula hospedeira. Em *T. brucei* foi relatada a presença de autofagossomos no protozoário após 24h de tratamento com rapamicina (Barquilla et al., 2008), entretanto em *T. cruzi* não há relatos até o momento. A manutenção da morfologia típica de tripomastigotas e amastigotas analisados sugere que o DMEM^{-/-} e rapamicina não induzem autofagia nas formas do parasito presentes no mamífero.

Por outro lado, foi possível observar a presença de parasitos circundados por membranas concêntricas e autofagossomos em macrófagos tratados com rapamicina (Figuras 4.8A,B). Esta é a primeira evidência

ultraestrutural da associação *T. cruzi*-autofagossomo, indicativo de xenofagia, mecanismo autofágico envolvido na degradação de patógenos (Deretic & Levine, 2009). Em tripanosomatídeos, estudos anteriores não demonstraram a associação direta dos protozoários e/ou do VP aos autofagossomos (Pinheiro et al., 2009; Cyrino et al., 2012). Na infecção de macrófagos por *T. gondii*, a fusão VP-autofagossomo também foi observada, sendo sugerida a eliminação do parasito pela via autofágica (Ling et al., 2006), corroborando a participação do mecanismo como via de morte de patógenos.

Visando demonstrar por outra técnica a participação da autofagia na infecção de macrófagos e células cardíacas por *T. cruzi*, investigamos a expressão e localização da proteína LC3 por microscopia de fluorescência. Nossos resultados apontaram a expressão constitutiva de LC3 em ambas as células controle apenas infectadas (Figuras 4.24A e 4.25A). Este dado corrobora com a análise ultraestrutural, reforçando estudos prévios onde células sem indução autofágica também apresentaram uma marcação basal de LC3 (Jiang et al., 2010; Li et al., 2012b). Utilizando a técnica de imunolocalização ultraestrutural, a presença de LC3 foi confirmada no interior de autofagossomos em células cardíacas infectadas (Figuras 4.26A,B). Esses dados indicam a participação da autofagia na infecção *per se*, assim como observado por Cyrino e colaboradores (2012) com *L. amazonensis* onde foi demonstrado um aumento na expressão de LC3 por *Western blot* em macrófagos infectados.

A incubação com rapamicina e DMEM^{-/-} levou a um aumento do percentual de macrófagos e células musculares cardíacas LC3-positivos (Figuras 4.24 e 4.25). Apesar de ser esperada uma correlação entre a expressão de LC3 em células infectadas e os percentuais de infecção, este fato não foi observado em todas as condições (Figuras 4.24B e 4.25B), reforçando a hipótese de que a associação LC3-parasito independe da exacerbação do processo autofágico como previamente descrito (Romano et al., 2009). Enquanto em macrófagos o estímulo autofágico levou a um aumento no percentual de células LC3 positivas associadas a parasitos apenas em tempos iniciais, em células musculares do coração este aumento é observado somente em tempos tardios. Uma possível justificativa para este resultado pode estar

relacionado ao potencial fagocítico diferenciado entre esses tipos celulares. Macrófagos são fagócitos profissionais motivo pelo qual internalizam os parasitos em menor tempo (Araújo-Jorge et al., 1992; Perrotta et al., 2011). Possivelmente, a cinética da via autofágica também seja mais acelerada nessas células do que em fagócitos não-profissionais como as células cardíacas (Meirelles et al., 1986; Maruyama et al., 2008).

A formação de CLs em resposta à infecção por *T. cruzi* e outras doenças infecciosas encontra-se bem documentada (revisto em Melo et al., 2011, 2012; D'Avila et. 2011). A interação patógeno-célula hospedeira leva a um aumento do número destas organelas, principalmente no citoplasma de células da resposta imune como os macrófagos onde atuam como locais de síntese de mediadores inflamatórios (eicosanóides) (revisto em Melo et al., 2011, 2012).

Um aspecto que vem despertando atenção é a interação intracelular entre CLs recém-formados e fagossomos contendo *T. cruzi*. O significado desta interação não se encontra bem esclarecido, podendo a mesma indicar uma estratégia do parasito para sobrevivência usurpando lipídios do hospedeiro ou mesmo um mecanismo de defesa deste (revisto em Melo et al., 2012). Pelo fato de CLs serem considerados organelas inflamatórias importantes nessa infecção e visando entender se a via autofágica interfere na formação de CLs, o número de CLs foi quantificado por microscopia de campo claro (Fig. 4.23).

Em células controles apenas infectadas, o número de CLs em macrófagos foi bastante superior que o detectada em células cardíacas. Dados do nosso grupo sobre a quantificação de CLs em HMC sem a presença do parasito corrobora que o aumento no número das organelas induzido pela infecção é mínimo (dados não mostrados). Dessa forma, a participação de CLs durante a infecção de células cardíacas é pequena. Por outro lado, o aumento do número de CLs observado em macrófagos encontra-se diretamente associado à infecção, conforme previamente demonstrado (Melo et al., 2003, 2006, 2009). Em células infectadas, a pré-incubação com rapamicina ou DMEM^{-/-} diminuiu a formação de CLs apenas em 6h, sendo semelhante ao controle em 24h, demonstrando que a indução autofágica não influencia a formação de CLs em macrófagos após o estabelecimento da infecção. Uma

possível explicação para este fenômeno seria que o sucesso da infecção pode ou não estar relacionado à participação da autofagia e a biogênese de CLs a depender do tipo celular envolvido como previamente relatado para *L. amazonensis* (Pinheiro et al., 2009).

É importante ressaltar que a biogênese dos CLs é regulada pela mTOR, representando um elo com a autofagia (Dong & Czaja, 2011). Contudo, a compreensão desta interface é complexa, havendo registros do envolvimento da via autofágica na degradação de CLs bem como na sua biogênese (Singh et al., 2009, Shibata et al., 2009, 2010). Nossos resultados apontam que não houve alteração no número médio de CLs, sendo necessários ensaios moleculares e bioquímicos mais detalhados para o melhor entendimento do papel da mTOR nas duas vias durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Por MET foi evidenciado a presença de CLs adjacentes ao retículo endoplasmático em macrófagos estimulados para autofagia (Figuras 4.5B,D, 4.7D, 4.9B e 4.10A-C). A proximidade entre o retículo e CL tem sido extensamente descrita nos diversos tipos celulares sendo associada a sua gênese (Wan et al., 2007). Além disso, a interação do CL com o parasito em macrófagos em *DMEM*^{-/-} sugere a participação dos CLs na infecção como mecanismo de eliminação do parasito ou de sobrevivência (revisto em Melo, 2009; Melo et al., 2012).

O conjunto de resultados apresentado nesta dissertação mostra que a autofagia é um processo que ocorre efetivamente na infecção por *T. cruzi*, e parece envolvido na resistência do hospedeiro ao parasito. Algumas hipóteses podem ser aventadas para explicar como a autofagia atuaria no mecanismo de resistência à infecção por *T. cruzi* em células fagocíticas e não fagocíticas profissionais. Uma possibilidade seria através da inibição da mTOR provavelmente impedindo a ativação de mecanismos associados à infecção como a via de PI3K, por meio de uma modulação negativa. Com a mTOR inibida, vias como PI3K e Akt/PKB seriam inativadas por *feedback*, alterando a participação delas na internalização do parasito, diminuindo a infecção. A indução da via autofágica também poderia provocar alterações no metabolismo mitocondrial e lipídico, reduzindo o aporte energético celular disponível para o

protozoário. Por fim, a via autofágica pode estar atuando sobre o parasito, contribuindo para sua eliminação pelas células hospedeiras. Entretanto, o entendimento do papel da autofagia na infecção por *T. cruzi* ainda requer futuras investigações no sentido de sedimentar este processo como mecanismo de resistência ou não da célula hospedeira.

6. CONCLUSÕES

1. A exacerbação do processo autofágico em macrófagos peritoneais e cardiomiócitos *in vitro* anterior à interação com *T. cruzi* reduziu a infecção e a proliferação de parasitos internalizados. A indução de autofagia após o estabelecimento da infecção reduziu parasito/100 células apenas em cardiomiócitos, indicando dependência do tipo celular.
2. A análise ultraestrutural mostrou que a pré-incubação de ambas as células com indutores autofágicos induziu o aparecimento de inúmeros autofagossomos e perfis concêntricos de membranas, além de alterações em mitocôndrias e Golgi. Indícios de xenofagia também foram observados.
3. O aumento da marcação para LC3 por imunofluorescência foi destacado em macrófagos em tempos iniciais e para células cardíacas em tempos maiores, sugerindo que estímulos autofágicos atuam em diferentes tempos em células distintas. A imunocitoquímica ultraestrutural confirmou a presença de LC3 no interior dos autofagossomos em células cardíacas infectadas.
4. A via autofágica parece interferir com a formação de CLs apenas em células envolvidas na resposta inflamatória do hospedeiro (macrófagos), as quais mostraram redução no número destas organelas em comparação aos controles infectados. Em células não inflamatórias, como as células musculares do coração, tanto a formação de CLs como a modulação destes pela via autofágica não foram detectadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*. 1996 Nov;84(2):231-44.

Akazawa H, Komazaki S, Shimomura H, Terasaki F, Zou Y, Takano H, et al. Diphtheria toxin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in mouse model of heart failure. *J Biol Chem*. 2004;279(39):41095-103.

Albertti LA, Macedo AM, Chiari E, Andrews NW, Andrade LO. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes Infect*. 2010 Sep;12(10):784-9.

Alvarez VE, Kosec G, Sant Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B. Blocking autophagy to prevent parasite differentiation: a possible new strategy for fighting parasitic infections? *Autophagy*. 2008a Apr;4(3):361-3.

Alvarez VE, Kosec G, Sant'Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 2008b Feb;283(6):3454-64.

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

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

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

Andreoli WK, Mortara RA. Acidification modulates the traffic of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes in Vero cells harbouring *Coxiella burnetii* vacuoles. *Int J Parasitol*. 2003 Feb;33(2):185-97.

Apt W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Des Devel Ther*. 2010;4:243-53.

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

Araujo-Jorge TC, Barbosa HS, Meirelles MN. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87 Suppl 5:43-56.

Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Feb;101(7):2034-9.

Avila HA, Simpson L. Organization and complexity of minicircle-encoded guide RNAs in *Trypanosoma cruzi*. RNA. 1995 Nov;1(9):939-47.

Barrias ES, Dutra JM, De Souza W, Carvalho TM. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Nov;363(3):828-34.

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

Barba I, Chavarria L, Ruiz-Meana M, Mirabet M, Agulló E, Garcia-Dorado D. Effect of intracellular lipid droplets on cytosolic Ca²⁺ and cell death during ischaemia-reperfusion injury in cardiomyocytes. J Physiol. 2009;587(Pt 6):1331-41.

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

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

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

Benitez D, Pezaroglo H, Martínez V, Casanova G, Cabrera G, Galanti N, et al. Study of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell death by NMR-visible mobile lipid analysis. Parasitology. 2012 Apr;139(4):506-15.

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

Besteiro S, Williams RA, Morrison LS, Coombs GH, Mottram JC. Endosome

sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. J Biol Chem. 2006 Apr;281(16):11384-96.

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

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

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

Caler EV, Morty RE, Burleigh BA, Andrews NW. Dual role of signaling pathways leading to Ca(2+) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun. 2000 Dec;68(12):6602-10.

Caler EV, Vaena de Avalos S, Haynes PA, Andrews NW, Burleigh BA. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. EMBO J. 1998 Sep;17(17):4975-86.

Calvet CM, Meuser M, Almeida D, Meirelles MN, Pereira MC. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression *in vitro* and *in vivo*. Exp Parasitol. 2004 May-Jun;107(1-2):20-30.

Chagas C. Nova tripanosomíase humana Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* gen. nov. sp. nov., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909;1:159- 218.

Chen X, Li M, Chen D, Gao W, Guan JL, Komatsu M, et al. Autophagy induced by calcium phosphate precipitates involves endoplasmic reticulum membranes in autophagosome biogenesis. PLoS One. 2012;7(12):e52347.

Corvera S, Czech MP. Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. Trends Cell Biol. 1998 Nov;8(11):442-6.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Acta Trop. 2010 Jul-Aug;115(1-2):5-13.

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

Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010 Jun;465(7301):S6-7.

Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol*. 2004 Feb;14(2):70-7.

Cuervo AM, Macian F. Autophagy, nutrition and immunology. *Mol Aspects Med*. 2012;33(1):2-13

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

D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, et al. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E₂ generation and increased parasite growth. *J Infect Dis*. 2011 Sep;204(6):951-61.

D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol*. 2008a Oct;8(10):1308-15.

D'Avila H, Roque NR, Cardoso RM, Castro-Faria-Neto HC, Melo RC, Bozza PT. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol*. 2008b Dec;10(12):2589-604.

DaRocha WD, Otsu K, Teixeira SM, Donelson JE. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Feb;133(2):175-86.

de Melo-Jorge M, PereiraPerrin M. The Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi* exploits nerve growth factor receptor TrkA to infect mammalian hosts. *Cell Host Microbe*. 2007 Jun;1(4):251-61.

de Souza EM, Araújo-Jorge TC, Bailly C, Lansiaux A, Batista MM, Oliveira GM, et al. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in *in vitro* and *in vivo* models. *Cell Tissue Res*. 2003 Nov;314(2):223-35.

De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2002a May;1(1):3.

De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*. 2002b;8(4):269-85.

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

De Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol*. 2010;2010.

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

DNDi, 2011. 2011 Annual Report. 80p.

DNDi, 2012a. <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas.html>; acesso em 10/12/2012

Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Mar;3(3):251-61.

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

Dong H, Czaja MJ. Regulation of lipid droplets by autophagy. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(6):234-40.

Duque, TLA Ultraestrutura de vacúolos autofágicos e fagossomos em macrófagos inflamatórios em resposta à infecção por *Mycobacterium bovis* – BCG [trabalho de conclusão de curso]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia; 2010.

Duque TLA, Souto XM, Andrade-Neto VV, Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RFS. Autophagic balance between mammals and protozoa: a molecular, biochemical and morphological review during Apicomplexa and Trypanosomatidae infections. Bailly Y, Esteves AR, orgs. *Autophagy*. Rijeka: In Tech; 2013.

Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdrón-López M, Colombo MI, Coombs GH, et al. Autophagy in protists. *Autophagy*. 2011 Feb;7(2):127-58.

Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy*. 2005;1(1):1-10

Fernandes MC, Cortez M, Geraldo Yoneyama KA, Straus AH, Yoshida N, Mortara

RA. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *Int J Parasitol.* 2007 Nov;37(13):1431-41

Fernandes MC, Cortez M, Flannery AR, Tam C, Mortara RA, Andrews NW. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J Exp Med.* 2011 May;208(5):909-21.

Fernandes AB, Neira I, Ferreira AT, Mortara RA. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. *Parasitol Res.* 2006 Dec;100(1):59-68.

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

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

Ferreira LF, Jansen AM, Araújo A. Chagas disease in prehistory. *An Acad Bras Cienc.* 2011 Sep;83(3):1041-4.

Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 2000 Jan;403(6766):199-203.

French CJ, Taatjes DJ, Sobel BE. Autophagy in myocardium of murine hearts subjected to ischemia followed by reperfusion. *Histochem Cell Biol.* 2010;134(5):519-26.

Garzoni LR, Masuda MO, Capella MM, Lopes AG, de Meirelles MeN. Characterization of $[Ca^{2+}]_i$ responses in primary cultures of mouse cardiomyocytes induced by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Jun;98(4):487-93

Gautret P, Cramer JP, Field V, Caumes E, Jensenius M, Gkrania-Klotsas E, et al. Infectious diseases among travellers and migrants in Europe, EuroTravNet 2010. *Euro Surveill.* 2012;17(26).

Genetex, 2012 <http://www.iconbio.com.tw/IconERP/UploadImage/GeneTex/Research/82/Autophagy.pdf>; acesso em 26/12/2012.

Geng J, Klionsky DJ. The Golgi as a potential membrane source for autophagy. *Autophagy*. 2010 Oct;6(7):950-1.

Gottlieb RA, Mentzer RM. Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:45-59.

Gull K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol*. 1999;53:629-55.

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

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

Gutierrez MG, Saka HA, Chinen I, Zoppino FC, Yoshimori T, Bocco JL, et al. Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb;104(6):1829-34.

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

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

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

Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*. 2009;11(12):1433-7.

Herman M, Gillies S, Michels PA, Rigden DJ. Autophagy and related processes in trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy*. 2006 2006 Apr-Jun;2(2):107-18.

Herman M, Pérez-Morga D, Schtickzelle N, Michels PA. Turnover of glycosomes during life-cycle differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Autophagy*. 2008 Apr;4(3).

Hissa B, Duarte JG, Kelles LF, Santos FP, del Puerto HL, Gazzinelli-Guimarães

PH, et al. Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(3):e1583.

Jiang M, Liu K, Luo J, Dong Z. Autophagy is a renoprotective mechanism during *in vitro* hypoxia and *in vivo* ischemia-reperfusion injury. Am J Pathol. 2010;176(3):1181-92.

Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Nov;8(11):931-7.

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

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy. 2012;8(4):445-544.

Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. Ageing Res Rev. 2011 Apr;10(2):205-15.

Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Dec;9(12):1004-10. PubMed PMID: 18971948.

Kuruvilla S, Balakrishnan K, Parvathy U. Right ventricular myocardium in Fallot's tetralogy: a light microscopic, morphometric and ultrastructural study. Images Paediatr Cardiol. 2004;6(4):1-30.

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

Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. Cell Mol Life Sci. 2012a Apr;69(7):1125-36.

Li P, Du Q, Cao Z, Guo Z, Evankovich J, Yan W, et al. Interferon- γ induces autophagy with growth inhibition and cell death in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells through interferon-regulatory factor-1 (IRF-1). Cancer Lett. 2012b;314(2):213-22.

Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJ, et al. Vacuolar

and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J Exp Med*. 2006;203(9):2063-71.

Longatti A, Tooze SA. Recycling endosomes contribute to autophagosome formation. *Autophagy*. 2012;8(11).

Luo S, Chen Q, Cebollero E, Xing D. Mitochondria: one of the origins for autophagosomal membranes? *Mitochondrion*. 2009 Jul;9(4):227-31.

Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Aug;8(8):622-32.

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

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

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

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

Marin-Neto JA, Rassi A. Update on Chagas heart disease on the first centenary of its discovery. *Rev Esp Cardiol*. 2009 Nov;62(11):1211-6.

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

Martins-Melo FR, Ramos AN, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality Related to Chagas Disease and HIV/AIDS Coinfection in Brazil. *J Trop Med*. 2012;2012:534649.

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

Matsushita K, Iwanaga S, Oda T, Kimura K, Shimada M, Sano M, et al. Interleukin-

6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. *Lab Invest.* 2005;85(10):1210-23.

Matsuzawa T, Kim BH, Shenoy AR, Kamitani S, Miyake M, Macmicking JD. IFN- γ elicits macrophage autophagy via the p38 MAPK signaling pathway. *J Immunol.* 2012;189(2):813-8.

Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Avila H, Martins AS, Rezende AP, Castro-Faria-Neto H, et al. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2008 Jan;283(4):2203-10.

Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.* 2010 Jul;20(7):748-62.

Meirelles MN, Chiari E, de Souza W. Interaction of bloodstream, tissue culture-derived and axenic culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. *Acta Trop.* 1982 Sep;39(3):195-203

Meirelles MN, Souto-Padrón T, De Souza W. Participation of cell surface anionic sites in the interaction between *Trypanosoma cruzi* and macrophages. *J Submicrosc Cytol.* 1984;16(3):533-45.

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

Melo RC. Acute heart inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by *Trypanosoma cruzi* infection. *J Cell Mol Med.* 2009 Feb;13(2):279-94.

Melo RC, Fabrino DL, D'Avila H, Teixeira HC, Ferreira AP. Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi in vivo*. *Cell Biol Int.* 2003;27(10):853-61.

Melo RC, D'Avila H, Wan HC, Bozza PT, Dvorak AM, Weller PF. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *J Histochem Cytochem.* 2011a May;59(5):540-56.

Melo RC, D'Ávila H, Bozza PT, Weller PF. Imaging lipid bodies within leukocytes

with different light microscopy techniques. *Methods Mol Biol.* 2011b;689:149-61.

Melo RC, Dvorak AM. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog.* 2012 Jul;8(7):e1002729.

Melo RC, Fabrino DL, Dias FF, Parreira GG. Lipid bodies: Structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflamm Res.* 2006 Aug;55(8):342-8.

Melo RC, Perez SA, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. *Traffic.* 2005;6(10):866-79.

Melo RC, Spencer LA, Perez SA, Neves JS, Bafford SP, Morgan ES, et al. Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. *Lab Invest.* 2009;89(7):769-81.

Melo TG, Meirelles MeN, Pereira MC. *Trypanosoma cruzi* alters adherens junctions in cardiomyocytes. *Microbes Infect.* 2008 Oct;10(12-13):1405-10.

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

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

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

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

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

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011a Nov;27:107-32.

Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011b Nov;147(4):728-41.

Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*. 1998 Sep;395(6700):395-8.

Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol*. 2010 Sep;12(9):823-30.

Münz C. Enhancing immunity through autophagy. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:423-49.

Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol*. 2012 May;14(5):634-43.

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

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

Naydenov NG, Harris G, Brown B, Schaefer KL, Das SK, Fisher PB, et al. Loss of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein α (α SNAP) induces epithelial cell apoptosis via down-regulation of Bcl-2 expression and disruption of the Golgi. *J Biol Chem*. 2012;287(8):5928-41.

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

Opperdoes FR, Borst P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett*. 1977 Aug;80(2):360-4.

Orenstein SJ, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol*. 2010 Sep;21(7):719-26.

Organização Mundial da Saúde. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases - First WHO report on neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases 2010.

Parker ER, Sethi A. Chagas disease: coming to a place near you. *Dermatol Clin*. 2011 Jan;29(1):53-62.

Parsons M. Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol.* 2004 Aug;53(3):717-24.

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

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

Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem.* 2000 Jan;275(2):992-8.

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

Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am.* 2012 Jun;26(2):275-91.

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

Ravikumar B, Moreau K, Rubinsztein DC. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy.* 2010;6(8):1184-6.

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

Rodrigues AA, Saosa JS, da Silva GK, Martins FA, da Silva AA, Souza Neto CP, et al. IFN- γ plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(4):e1598.

Rodrigues MM, Ribeirão M, Boscardin SB. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol Lett.* 2000 Jul;73(1):43-50.

Rodríguez A, Martínez I, Chung A, Berlot CH, Andrews NW. cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by

trypanosomes. J Biol Chem. 1999 Jun;274(24):16754-9.

Rohloff P, Docampo R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol. 2008 Jan;118(1):17-24.

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

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

Rubin-de-Celis SS, Uemura H, Yoshida N, Schenkman S. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. Cell Microbiol. 2006 Dec;8(12):1888-98.

Sandes JM, Borges AR, Junior CG, Silva FP, Carvalho GA, Rocha GB, et al. 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. Bioorg Chem. 2010 Oct;38(5):190-5.

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

Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Toma HK, Georg I, Burgoa MR, Lima MM. Eco-epidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments. Parasitol Res. 2012 Apr;110(4):1481-5. PubMed PMID: 21979785. eng.

Schenkman S, Robbins ES, Nussenzweig V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. Infect Immun. 1991 Feb;59(2):645-54.

Schenkman S, Ferguson MA, Heise N, de Almeida ML, Mortara RA, Yoshida N. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in

metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1993 Jun;59(2):293-303.

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

Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. Mol Cell. 2010 Oct;40(2):310-22.

Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. Annu Rev Microbiol. 1995;49:117-43.

Shibata M, Yoshimura K, Furuya N, Koike M, Ueno T, Komatsu M, et al. The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. Biochem Biophys Res Commun. 2009;382(2):419-23.

Shibata M, Yoshimura K, Tamura H, Ueno T, Nishimura T, Inoue T, et al. LC3, a microtubule-associated protein1A/B light chain3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation. Biochem Biophys Res Commun. 2010;393(2):274-9.

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

Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp Med. 1992;175(1):169-74.

Silveira AC, Dias JC. [The control of vectorial transmission]. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44 Suppl 2:52-63.

Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. Nature. 2009 Apr;458(7242):1131-5.

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

Soeiro MeN, Paiva MM, Barbosa HS, Meirelles MeN, Araújo-Jorge TC. A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after infection. Cell Struct Funct. 1999 Jun;24(3):139-49.

Soeiro MeN, Mota RA, Batista DaG, Meirelles MeN. Endocytic pathway in mouse

cardiac cells. *Cell Struct Funct.* 2002 Dec;27(6):469-78.

Stecconi-Silva RB, Andreoli WK, Mortara RA. Parameters affecting cellular invasion and escape from the parasitophorous vacuole by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Oct;98(7):953-8.

Stuart K, Panigrahi AK. RNA editing: complexity and complications. *Mol Microbiol.* 2002 Aug;45(3):591-6.

Takahashi Y, Meyerkord CL, Hori T, Runkle K, Fox TE, Kester M, et al. Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy.* 2011;7(1):61-73.

Tardieux I, Nathanson MH, Andrews NW. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. *J Exp Med.* 1994 Mar;179(3):1017-22.

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

Todorov AG, Andrade D, Pesquero JB, Araujo ReC, Bader M, Stewart J, et al. *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells *in vitro* by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. *FASEB J.* 2003 Jan;17(1):73-5.

Todorov AG, Einicker-Lamas M, de Castro SL, Oliveira MM, Guilherme A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem.* 2000 Oct;275(41):32182-6.

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

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

Villalta F, Scharfstein J, Ashton AW, Tyler KM, Guan F, Mukherjee S, et al. Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions. *Parasitol Res.* 2009 Jun;104(6):1251-60. PubMed PMID: 19283409.

Waghbi MC, Keramidas M, Bailly S, Degrave W, Mendonça-Lima L, Soeiro MeN, et al. Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *Am J Pathol*. 2005 Oct;167(4):993-1003.

Waghbi MC, Keramidas M, Calvet CM, Meuser M, de Nazaré C Soeiro M, Mendonça-Lima L, et al. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Aug;51(8):2905-10.

Wan HC, Melo RC, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J*. 2007;21(1):167-78.

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

Wang Y, Karnataki A, Parsons M, Weiss LM, Orlofsky A. 3-Methyladenine blocks *Toxoplasma gondii* division prior to centrosome replication. *Mol Biochem Parasitol*. 2010 Oct;173(2):142-53.

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

Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl PD, Isola EL. Regulation of *Trypanosoma cruzi* invasion of nonphagocytic cells by the endocytically active GTPases dynamin, Rab5, and Rab7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Mar;291(3):516-21.

Williams RA, Smith TK, Cull B, Mottram JC, Coombs GH. ATG5 is essential for ATG8-dependent autophagy and mitochondrial homeostasis in *Leishmania major*. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002695.

Williams RA, Woods KL, Juliano L, Mottram JC, Coombs GH. Characterization of unusual families of ATG8-like proteins and ATG12 in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Autophagy*. 2009 Feb;5(2):159-72. PubMed PMID: 19066473.

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

Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA.

Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci.* 2003 Sep;116(Pt 17):3611-22.

Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007 Oct;9(10):1102-9.

Yamamoto H, Kakuta S, Watanabe TM, Kitamura A, Sekito T, Kondo-Kakuta C, et al. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J Cell Biol.* 2012;198(2):219-33.

Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Apr;22(2):124-31.

Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 2009;5(8):1180-5.

Yoshida N, Dorta ML, Ferreira AT, Oshiro ME, Mortara RA, Acosta-Serrano A, et al. Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. *Mol Biochem Parasitol.* 1997 Jan;84(1):57-67.

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

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

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

8. ANEXO

Duque TLA, Souto XM, Andrade-Neto VV, Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RFS. Autophagic balance between mammals and protozoa: a molecular, biochemical and morphological review during Apicomplexa and Trypanosomatidae infections. Bailly Y, Esteves AR, orgs. Autophagy. Rijeka: In Tech; 2013. (In press).

INTECH

open science | open minds

www.intechopen.com

NOTIFICATION OF ACCEPTANCE

November 11, 2012

Dear Dr. Menna-Barreto,

On behalf of the Editorial Board it is my pleasure to inform you that the manuscript titled "Autophagic balance between mammals and protozoa: a molecular, biochemical and morphological review during Apicomplexa and Trypanosomatidae infections" has been accepted for publication in the book "Autophagy", ISBN 980-953-307-971-9.

We firmly believe that your contribution will be of great importance for the scientific community.

Sincerely yours,

Aleksandar Lazinica, CEO



INTECH
d.o.o. Rijeka

InTech Europe

University Campus STeP Ri, Slavka Krautzeka 83/A, 51000 Rijeka, Croatia | T +385 (0) 51 770 447 | F +385 (0) 51 686 166 | E info@intechopen.com

InTech China

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai, No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China | T +86 21 624 898 20 | F +86 21 624 89 821

1

2 **Autophagic Balance Between Mammals and Protozoa: A** 3 **Molecular, Biochemical and Morphological Review of** 4 **Apicomplexa and Trypanosomatidae Infections**

5 Thabata Lopes Alberto Duque**,
6 Xênia Macedo Souto**,
7 Valter Viana de Andrade-Neto,
8 Vítor Ennes-Vidal and
9 Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

10 Additional information is available at the end of the chapter

11 <http://dx.doi.org/10.5772/54970>

12 **1. Introduction**

13 Protozoa are unicellular eukaryotes that are able to live as parasites or as free-living
14 organisms and interact with a great variety of environments and organisms, from bacte-
15 ria to man; in addition, they represent one of most important sources of parasitic diseas-
16 es. Every year, more than one million people die from complications from protozoal
17 infections worldwide [1-5]. Of the medically relevant protozoa, Trypanosomatidae and
18 Apicomplexa constitute a substantial group including the causative agents of several
19 human diseases such as Chagas disease, sleeping sickness, leishmaniasis, malaria and
20 toxoplasmosis [1,5,6]. The life cycles of these parasites are highly complex, involving
21 different hosts and different specific interactions with a variety of cells and tissues [7- 11].
22 Some of these parasites live in the extracellular matrix or blood of host mammals, but the
23 majority of them infect host cells to complete their cycle. Despite the high infection and
24 mortality rates of these protozoa, especially in low-income populations of developing
25 regions such as Africa, Asia and the Americas, current therapies for these parasitic diseases
26 are very limited and unsatisfactory. The development of efficient drugs is urgently
27 necessary, as are serious public health initiatives to improve patients' quality of life [12-16].

2 Autophagy

1 The Trypanosomatidae family belongs to the order Kinetoplastida and is comprised of
2 flagellated protists characterised by the presence of the kinetoplast, a DNA-enriched portion
3 of the mitochondrion localised close to the flagellar pocket. The most studied pathogenic
4 trypanosomatids are the following: (a) *Trypanosoma brucei*, which is responsible for sleeping
5 sickness in Africa; (b) *T. cruzi*, which is the causative agent of Chagas disease in Latin America;
6 and (c) a variety of *Leishmania* species that cause leishmaniasis in tropical and subtropical areas
7 worldwide. These illnesses have been classified by the World Health Organization as neglected
8 diseases, which affect people living in poverty in developing countries and for which no
9 efficient therapy is available [17-19].

10 The Apicomplexa family encompasses a large group of protists, including approximately 5,000
11 known parasitic species, which are characterised by the presence of an apical complex
12 containing a set of organelles involved in the infection process. Apicomplexan parasites infect
13 invertebrate and vertebrate hosts, including humans and other mammals. The most serious
14 parasitic disorder is caused by apicomplexan *Plasmodium* species, the etiological agent of
15 malaria, which causes more than one million deaths annually [1]. Toxoplasmosis is another
16 important disease caused by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*; it has been estimated
17 that almost half of the human population worldwide is infected with this protozoa [20]. The
18 life cycle of the apicomplexan parasites generally consists of complex asexual and sexual
19 reproduction, but some differences are observable among distinct genera. Malaria transmis-
20 sion occurs during the blood feeding of the *Anopheles* mosquito, whereas toxoplasmosis is
21 mainly transmitted by the ingestion of raw meat or contaminated cat feces.

22 Autophagy is a physiological self-degradative pathway essential for the maintenance of the
23 metabolic balance in eukaryotes, leading to the turnover of cellular structures during both the
24 normal cell cycle and during conditions of stress, such as starvation [21,22]. This process
25 depends on double-membrane vesicles known as autophagosomes, which are responsible for
26 the engulfment of macromolecules and organelles and the recycling of their components
27 without an inflammatory response [23]. In eukaryotic cells, proteins known as Atgs contribute
28 to the formation of autophagosomes and their targeting to lysosomes [24]. The autophagic
29 machinery interfaces with many cellular pathways, such as that of the immune response and
30 the inflammatory process, and acts as an inductor or suppressor of these processes [25]. Some
31 molecules and organelles can undergo autophagy by specific proteins, such as in the selective
32 pathway known as xenophagy, which is also observed in the degradation of intracellular
33 pathogens [26,27]. The involvement of autophagy in this process has been demonstrated in the
34 interactions of different pathogens with the host cells [28-30]. In protozoan infections, the role
35 of autophagy has been debated in light of conflicting evidence presented in the literature,
36 which tends to vary with the experimental model. Some studies suggest that parasites evade
37 host cell defences using autophagy, while others suggest that the host uses autophagy to
38 eliminate the pathogen [31-35]. However, there is no doubt that the autophagic machinery
39 decisively influences the pathogenesis and virulence of protozoan infections; this machinery
40 may therefore represent a promising target for drug discovery [36]. The autophagic process
41 also occurs in the protozoa [37,38] and could occur in parallel to the host cell pathway, thus
42 increasing the complexity of the phenomena. In the following sub-sections, the biology of

1 Trypanosomatidae and Apicomplexa protozoa will be reviewed in relation to the role of
2 autophagy during the infection of the host cells.

3 **2. Trypanosomatids and autophagy**

4 As previously mentioned, the transmission of neglected diseases caused by trypanosomatids
5 (sleeping sickness, Chagas disease and leishmaniasis) depends on an insect vector, and the
6 environmental change from one host to another is a drastic event for the protozoa. To complete
7 its life cycle, many metabolic and morphological changes must occur for the parasite to survive
8 in a new host [39-42]. In addition to the kinetoplast, other characteristic ultrastructural
9 structures are present in these parasites, including a single mitochondrion, unique flagella,
10 sub-pellicular microtubules, glycosomes, acidocalcisomes and reservosomes (the last one is
11 present exclusively in *T. cruzi*) [8]. In the context of the remodelling of sub-cellular structures,
12 autophagy is greatly involved in eukaryotic homeostasis (including in that of trypanosoma-
13 tids). However, the deregulation of this pathway, which is induced by conditions of stress,
14 also leads to the parasite's death (Table 1). The sequencing of the complete genome of trypano-
15 somatids has enabled the identification of parasitic genes [43-45]. Blast analysis comparing
16 the trypanosome genome with yeast and mammalian genomes, with a particular emphasis on
17 genes encoding autophagic machinery, has indicated the presence of some *ATG* genes in
18 trypanosomatids [46,47]. However, the partial lack of a ubiquitin-like system, which is crucial
19 for autophagosome formation, and the absence of cytoplasm-to-vacuole-targeting pathway
20 orthologs suggest that these parasites have alternative autophagic features.

21 **3. *T. brucei***

22 *T. brucei* is the etiological agent of sleeping sickness (or African trypanosomiasis) and is
23 transmitted by the infected tsetse fly (*Glossina* sp.). After a blood feeding, procyclic trypomastigotes migrate from the insect midgut to the salivary gland where they undergo differentiation
24 to infective metacyclic forms. Subsequently, these metacyclic trypomastigotes are inoculated
25 into the mammalian host during the blood meal of the fly and differentiate into a proliferative
26 bloodstream slender form. Interestingly, after a new differentiation, adapted short-stumpy
27 forms evade the host immune system and disseminate the infection to the whole body; these
28 forms are also able to cross the blood-brain barrier, which causes severe behavioural abnormal-
29 ities, such as somnolence during daytime [48] (Figure 1). Unlike all other pathogenic
30 trypanosomatids, which have an intracellular life-stage, *T. brucei* remains in the bloodstream
31 of the mammalian host throughout the process of infection and, as such, is exposed to different
32 environmental conditions that can trigger autophagy.

34 **3.1. Role of autophagy in *T. brucei***

35 The first report on this parasite and autophagy was published in the 1970s by Vickerman and
36 colleagues. These authors described the presence of myelin-like structures in different forms

4 Autophagy

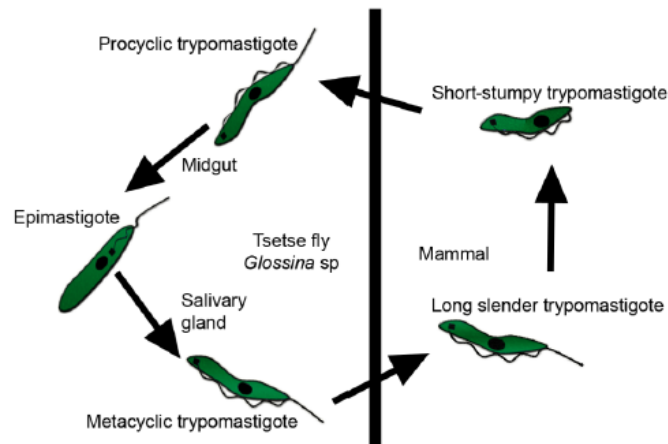
1 of the parasite observed by transmission electron microscopy [49, 50]. Many years later, it was
2 suggested that the autophagic pathway is involved in the turnover of glycosomes during
3 protozoan differentiation [51]. Glycosomes are peroxysome-like organelles that perform early
4 glycolytic steps and are also involved in lipid metabolism. It was demonstrated that glycosome
5 contents are altered depending on the form of the parasite, with many of these organelles being
6 close to glycosomes during the differentiation process. A similar phenomenon was observed
7 after nutrient deprivation of the parasite, reinforcing the fact that differentiation may cause
8 the degradation of glycosomes by pexophagy.

9 Further genomic and bioinformatic analyses were performed that identified in *T. brucei* many
10 ATG orthologs to those of yeasts and mammals [47,52]. These genes are involved in different
11 steps of the autophagic pathway, such as induction (*ATG24*, *PEX14*, *TOR1* and *TOR2*, *VAC8*),
12 vesicle nucleation (*ATG6*, *VPS15* and *VPS34*) and vesicle expansion and completion (*ATG3*,
13 *ATG7*, *ATG9*, two isoforms of *ATG4* and *ATG8*). Two isoforms of Atg4 and two of Atg8 were
14 recently characterised structurally [53], and it was postulated that Atg8.2 is essential for
15 autophagosome formation and that Atg8 depletion is associated with delayed cell death [54].

16 It is thought that many drugs may trigger autophagy in African trypanosomes. Dihydroxyac-
17 etone (DHA), spermine (snake venom) and vasoactive intestinal peptide (VIP – a neuropep-
18 tide secreted by the immune system) induce the appearance of morphological features of
19 autophagy in *T. brucei* [55-58]. DHA is an interesting compound to be used in therapy for
20 sleeping sickness because its phosphorylation is DHA kinase-dependent, and DHA kinase is
21 present in mammals and other eukaryotes but not in trypanosomes. After DHA uptake, this
22 compound is not eliminated, leading to typical morphological characteristics of autophagy
23 similar to those found in rapamycin treatment. In another report [59], the authors showed that
24 hydrogen peroxide can produce the appearance of autophagic profiles, suggesting that the
25 release of reactive oxygen species acts as a signal in the autophagic pathway in *T. brucei*, as it
26 does in other eukaryotic cells [60-62].

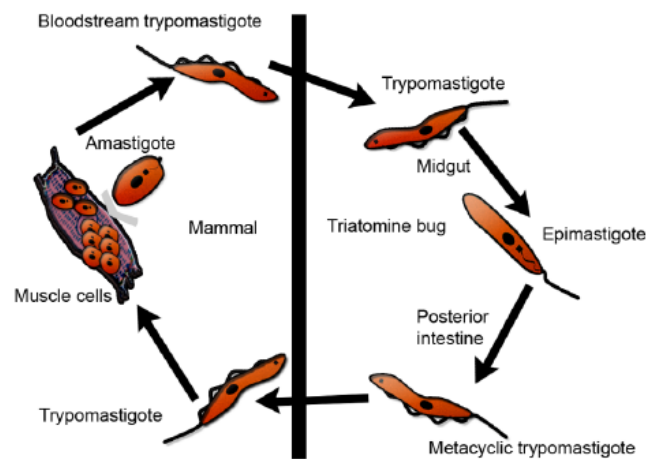
27 **4. *T. cruzi***

28 *T. cruzi* is the causative agent of Chagas disease. It is mainly transmitted by triatomine bugs,
29 which are commonly known as “kissing bugs”. In the insect midgut, proliferative forms of the
30 parasite called epimastigotes differentiate to metacyclic trypomastigotes after migration to the
31 posterior intestine. During the blood meal, triatomines eliminate urine and feces with infective
32 trypomastigotes that then gain access to the vertebrate bloodstream. After internalisation in
33 the host cell, trypomastigotes remain in parasitophorous vacuoles (PV) that fuse with lyso-
34 somes, allowing an acidification of this compartment, which is an essential step towards
35 differentiation into proliferative amastigotes. In the cytosol, successive parasite cycles occur
36 until a new intracellular differentiation to trypomastigotes occurs; it is these forms that are
37 responsible for the infection and dissemination to other cells and tissues [8] (Figure 2).



62

63 **Figure 1.** *T. brucei* life cycle.



1

2 **Figure 2.** *T. cruzi* life cycle.

3 **4.1. Role of autophagy in *T. cruzi***

4 Ultrastructural evidence of autophagy in *T. cruzi* was observed after the treatment of epimas-
 5 tiges and bloodstream trypomastigotes with drugs; the appearance of myelin-like figures
 6 was the most recurrent feature detected [63-67]. Recently, the synergistic combination of
 7 amiodarone and posaconazole was able to trigger autophagy in replicative amastigotes [68].

6 Autophagy

1 In this way, different classes of therapeutic agents are able to induce the formation of auto-
2 phagosomes, an event associated with parasite-related autophagic cell death, being the
3 interplay between other programmed cell death as apoptosis or necrosis not discarded [69].
4 Due to the limitations of cell models, previous studies of different parasite forms have
5 employed alternative techniques, such as monodansylcadaverine (MDC) staining and ATG
6 gene expression, to demonstrate autophagy in the parasite [66,67]. Unfortunately, *T. cruzi*
7 molecular machinery does not allow the use of double-stranded RNA to knock down target
8 RNAs [70]; in addition, the lack of recognition of protozoan proteins by anti-Atg commercial
9 antibodies hampers the evaluation of autophagy in this parasite. In spite of the advances in
10 molecular and cellular biology, transmission electron microscopy remains a gold standard for
11 autophagy analysis [71,72].

12 Aside from the description of autophagosomes in all *T. cruzi* life stages, description of the Atg
13 cascade involved in autophagosome formation is not complete. Almost all *T. brucei* ATG genes
14 have ortholog genes in *T. cruzi* [37,47]. In this parasite, two isoforms of Atg8 were described,
15 with only Atg8.1 localised in autophagosomes as expected. These data suggest that there is
16 only partially shared autophagic machinery, as is observed in human Atg8 orthologs [37]. In
17 another study [37], the authors described the participation of *T. cruzi* Atg4 and Atg8 isoforms
18 under conditions of nutritional stress and in the differentiation process from epimastigotes to
19 metacyclic trypomastigotes, a process known as metacyclogenesis. The authors observed a
20 remarkable expression of Atg8.1 by immunofluorescence microscopy, which was suggestive
21 of intense autophagy in differentiating epimastigotes. Moreover, Atg8 co-localised with
22 reservosomes, which are pre-lysosomal compartments related to energy supply that are
23 present only in epimastigotes [73,74]. The reservosomal content consumed during metacyclo-
24 genesis and the presence of Atg8 in this organelle strongly suggest that there is crosstalk
25 between autophagy and reservosomes [75,76]. Transmission electron microscopy studies have
26 produced images from endoplasmic reticulum profiles surrounding reservosomes that
27 indicate the possible origin of preautophagosomal structures [66]. It is well known that PI3K
28 inhibitors, such as 3-methyladenine and wortmannin, prevent autophagy in different experi-
29 mental models [54,66]; however, these data are controversial due to a previous report dem-
30 onstrating that treatment with kinase inhibitors staurosporine, genistein, 3-methyladenine and
31 wortmannin led to the formation of autophagosomes [77]. The data indicate the necessity of
32 careful use of PI3K inhibitors to block autophagy and the urgent need for the development of
33 new specific autophagic inhibitors [78].

34 4.2. Host cell autophagy and *T. cruzi* infection

35 Though thought to be essential for parasite success, lysosomal fusion could be involved in
36 autophagy during host cell interaction and might contribute to the process of degradation and
37 elimination of *T. cruzi*. In 2009, the role of autophagy in parasite entry and co-localisation with
38 the PV was described, resulting in increased infection of Chinese hamster ovary cells; this
39 observation was subsequently confirmed in macrophage and heart cell lineages [34,79].
40 Starvation conditions and the addition of rapamycin led to an increase in the scale of the
41 infection; this increase was partially reversed by 3-methyladenine, wortmannin and vinblas-

1 tine, suggesting that autophagy favours the parasite during *T. cruzi*-host cell interactions.
2 However, other groups demonstrated that classical autophagic stimuli (nutritional stress and
3 rapamycin) did not produce an increase in parasite proliferation or even in the number of
4 infected cells [33]. Recently, studies have emphasised role of autophagy in the control of *T.*
5 *cruzi* infection using different cells and parasite strains (Figure 3) [80,81]. Once more, the
6 conflicting data presented in the literature need to be further debated in light of the complexity
7 of the protozoal strains and host cell models employed.

8 **5. *Leishmania* species**

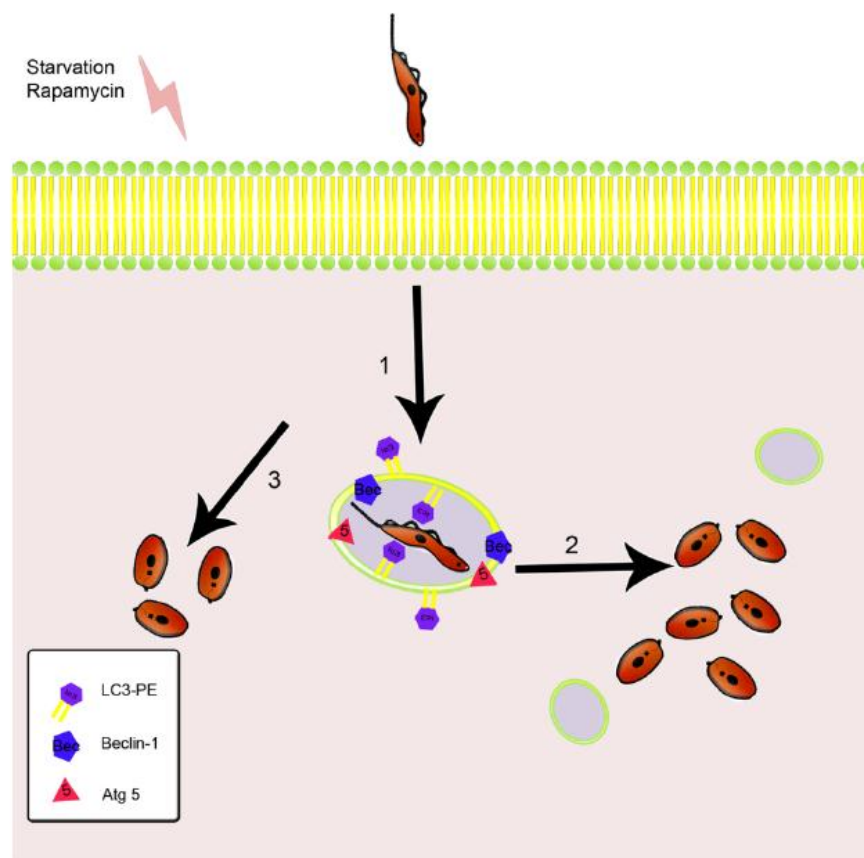
9 The other medically important trypanosomatids are *Leishmania* species. Leishmaniasis is
10 transmitted to mammals by sandflies, mainly of the *Phlebotomus* and *Lutzomia* genuses.
11 Amastigotes differentiate into replicative procyclic promastigotes in the digestive tract of these
12 sandflies, proliferate in the Phlebotominae gut, and then migrate to the proboscis where a new
13 differentiation occurs to metacyclic promastigotes, the infective forms of the parasite. During
14 the sandflies' blood meals, metacyclic promastigotes are inoculated into mammalian tissue
15 and are phagocytised by macrophages. Inside the host cells, promastigotes differentiate into
16 amastigotes that replicate and are responsible for cell lysis and dissemination in the organism
17 (Figure 4). Currently, more than 20 species of *Leishmania* are known, each causing different
18 clinical manifestations of the disease, including cutaneous leishmaniasis and visceral leish-
19 maniasis (or Kala-azar). The pathogenicity depends on the *Leishmania* species and the host's
20 immune response [8].

21 **5.1. Role of autophagy in *Leishmania* sp.**

22 Many groups have investigated autophagy cell death induced by drugs or antimicrobial
23 peptides in various *Leishmania* species using electron microscopy and MDC staining [82-89].
24 Bioinformatics analysis has been a crucial checkpoint in the characterisation of ATG and TOR
25 pathways in trypanosomatids [38,47,90]. In 2006, the role of autophagy in the differentiation
26 process of *L. major* and *L. Mexicana* was first evaluated [38,90]. The authors developed *L.*
27 *major* VPS4, a mutant that could not complete the differentiation to the infective forms due to
28 interference in autophagosome formation during conditions of starvation. The increase in Atg8
29 expression in differentiating forms supports the hypothesis that autophagy plays a pivotal role
30 in metacyclogenesis [38,91]. In *L. mexicana*, the lack of cysteine peptidases CPA and CPB
31 impairs autophagosomes formation and parasite differentiation; this finding is corroborated
32 by the results of wortmanin treatment and ATG deletion [90].

33 Recently, a subunit of protein kinase A in *L. donovani* that interferes with autophagy and
34 protozoa differentiation was identified [92]. As observed in other trypanosomatids, the
35 presence of Atg8-like proteins and their association with Atg4 in *Leishmania* species indicates
36 that these proteins play a role in vesicle expansion [93]. Interestingly, the Atg5-Atg12 complex
37 involved in autophagosome elongation was not previously detected [47], but recent studies
38 have demonstrated its existence. It has also been shown that Atg5 deletion severally affects

8 Autophagy



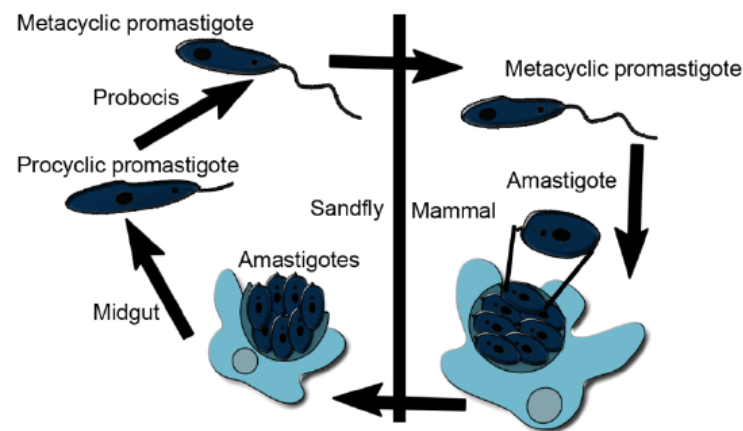
59

60 **Figure 3.** Autophagy in *T. cruzi*-host cell interaction. Romano et al [34] showed the co-localization of parasite vacuole
 61 with Atg proteins in the beginning of infection (1). Moreover, the replication of amastigotes is the same with or with-
 62 out autophagy induction (2) [33,34]. Rapamycin and starvation control infection reducing the number of amastigotes
 63 per cell (3) [80,81].

1 parasite homeostasis, producing a phenotype characterised by mitochondrial disruption,
 2 phospholipid accumulation and abnormal promastigote morphology [93,94]. Table 1 summa-
 3 rises the autophagic events in the three pathogenic trypanosomatids described in this chapter.

4 5.2. Host cell autophagy and *L. amazonensis* infection

5 The connection between the endosomal/lysosomal pathway and the PV results in macromo-
 6 lecules being taken up by the parasite, as demonstrated in *T. cruzi* infection [96]. In this context,
 7 a notable increase in the proliferation of *L. amazonensis* amastigotes was observed after
 8 autophagic induction by nutritional deprivation, rapamycin treatment or interferon-gamma.
 9 This mechanism was partially reversed by the autophagic inhibitors wortmaninn or 3-
 10 methyladenine, which significantly reduced amastigote replication (Figure 5) [33]. However,



62

63 **Figure 4.** *Leishmania* sp. life cycle.

1 a recent report presented no correlation between the increase in LC3 expression and height-
 2 ened *L. amazonensis* infection after treatment with autophagy inducers and inhibitors. In
 3 addition, macrophage autophagy was observed in inflammatory infiltrates of *L. amazonensis*-
 4 infected mice [97] and in natural human *L. donovani* infection [98].

5 6. Apicomplexa and autophagy

6 The phylum Apicomplexa comprises one of the most medically relevant groups of protists,
 7 which cause serious health and economic problems. Among these parasites, *Toxoplasma gondii*
 8 and *Plasmodium* species are well-known apicomplexans; it is estimated that malaria caused by
 9 *P. falciparum* kills over a million people annually. Another widespread disease is toxoplasmo-
 10 sis, which is caused by the apicomplexan parasite *T. gondii*; the severity of disease caused by
 11 this organism is directly related to patients' immunosuppression and is characterised by
 12 congenital transmission. In this context, knowledge of the detailed mechanisms involved in
 13 parasite infection and survival, including the role of autophagy, could contribute important
 14 information to the development of novel strategies for controlling Apicomplexa infections.
 15 Autophagy is an evolutionarily conserved pathway found in all eukaryotes, from unicellular
 16 organisms to metazoans; orthologs for approximately 30% of autophagy-related genes have
 17 been detected in apicomplexan sequenced genomes [99].

18 Among the key molecules involved in early autophagy steps, Atg1/ULK complex, Atg8 and
 19 Atg9 play crucial roles in cargo selectivity and in autophagosome formation [100,101]. Unlike
 20 other cell models, in Apicomplexa protozoa, the Atg8 C-terminal appears to not undergo
 21 processing before its association with phosphatidylethanolamine (PE) in the membrane of

10 Autophagy

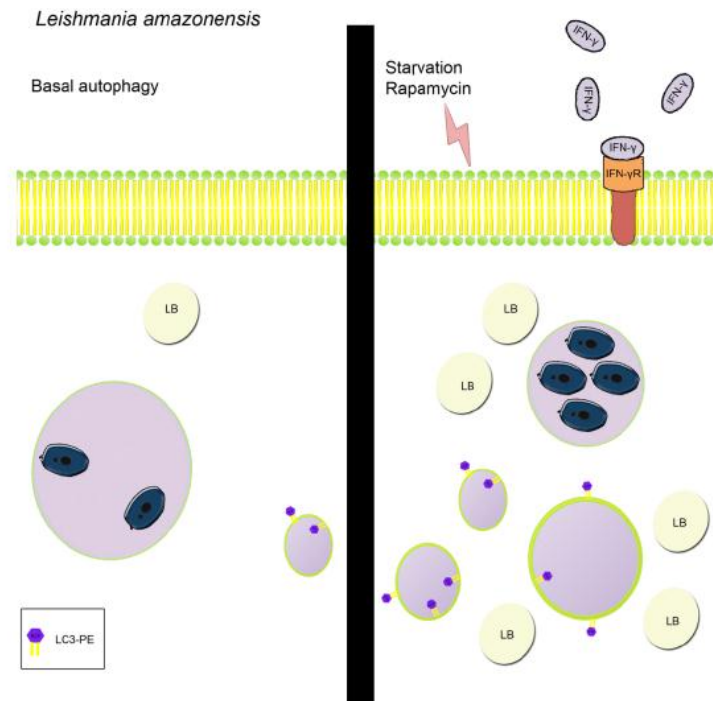
Parasite	Life-stage	Phenotype	Stimuli	References
<i>T. brucei</i>	bloodstream trypomastigotes	autophagic cell death	DHA, neuropeptides, rapamycin, starvation	[55,58, 59]
	procyclic trypomastigotes	autophagic cell death	spermine (snake venom)	[57]
		Autophagy-induced differentiation	rapamycin, starvation	[54,56]
		unfolded protein response in endoplasmic reticulum associate with autophagy	DTT	[95]
<i>T. cruzi</i>	epimastigotes, trypomastigotes	autophagic cell death	SBIs; LPAs and cetoconazole; naphthoquinones; naphthoimidazoles; MBHA; posoconazole and amiodarone	[63-65,67, 68,71,72,]
	metacyclic trypomastigotes	Autophagy-induced differentiation	starvation; differentiation medium	[37]
<i>L. amazonensis</i>	promastigotes, amastigotes	autophagic cell death	amiodarone; elatol; lipophilic diamine	[83,86,89]
<i>L. chagasi</i>	promastigotes	autophagic cell death	yangambin	[87]
<i>L. donovani</i>	promastigotes	autophagic cell death	antimicrobial peptides; cryptolepine	[82,88]
<i>L. major</i>	promastigotes, amastigotes	autophagic cell death	cathepsin inhibitors	[85]
	metacyclic promastigotes	autophagy induces differentiation	differentiation medium; starvation	[38,91]
<i>L. donovani</i>	metacyclic promastigotes	autophagy induces differentiation	differentiation medium; starvation	[90]

42 DHA: Dihydroxyacetone; DTT: dithiothreitol; SBIs: sterol biosynthesis inhibitors; LPAs: lysophospholipid analogues;
43 MBHA: Morita–Baylis–Hillman adduct.

44 **Table 1.** Summary of autophagic events in trypanosomatids

1 autophagosomes, suggesting a different regulation of this Atg protein in these organisms than
2 in mammals and fungi [102]. Using a technique to detect lipidated Atg8 in *Plasmodium* species,
3 only a single band corresponding to ATG8 was observed, suggesting that this parasite's Atg8
4 exists predominantly in the PE-conjugated form [22].

5 Two important kinases have opposing roles in the autophagic process: TOR (target of rapa-
6 mycin) and class III phosphatidylinositol3-kinase (PI3K) [78,103]. In well-established auto-
7 phagic models, TOR and class III PI3K represent negative and positive regulators, respectively,



15

16 **Figure 5.** Autophagy in *L. amazonensis*-host cell interaction. When autophagy is induced, more amastigotes replicate
 17 and PV is smaller than in basal autophagic cells. Also, more lipid bodies are present, increasing infection and signaling
 18 to replication [33,97].

1 that act through complexes with regulatory subunits orchestrated by signalling cascades.
 2 Analysis of the *T. gondii* genome revealed the presence of TOR and PI3K but not of other
 3 proteins crucial to the formation of these complexes [99]. Curiously, no genes for TOR complex
 4 machinery were found in the *Plasmodium* genome. Thus, it is possible that these unicellular
 5 eukaryotes have specific unknown proteins for several steps of the autophagic pathway
 6 instead of an absence of key proteins [22,104].

7 *T. gondii*

8 *T. gondii* is an obligate intracellular parasite with a complex life cycle involving one definitive
 9 feline host where the sexual phase occurs and intermediate hosts, such as birds, other mammals
 10 and man [105]. The main transmission routes to humans are the following: (i) the ingestion of
 11 raw meat containing tissue cysts (essentially bradyzoites forms); (ii) the ingestion of water and
 12 food contaminated with feline feces residue containing oocysts; and (iii) transplacental
 13 pathway of tachyzoites [106]. After oral ingestion, tissue cysts or oocysts rupture, liberating

12 Autophagy

1 the slow-replicating forms known as bradyzoites and sporozoites, respectively, which then
2 invade intestinal epithelial cells. In the intracellular environment, the parasites differentiate
3 into the fast-replicating tachyzoites that proliferate inside the host cell PV. The sustained
4 infection depends on the modification of the PV membrane by the insertion of *T. gondii* secreted
5 proteins, which prevent the fusion to lysosomes and, consequently, the elimination of the
6 parasite (Figure 6) [20,107].

7 In healthy adults, *T. gondii* cysts are established in the host cells mainly in the eyes, brain and
8 muscles during the chronic phase of toxoplasmosis [108]; however, in immunocompromised
9 patients, such as HIV-positive patients, or in congenital toxoplasmosis, the disease becomes
10 much more severe, and its complications could lead to death [20,109,110]. Despite the high
11 percentage of people infected, the available therapy for toxoplasmosis is effective only in the
12 tachyzoite stage and presents limited efficacy against the tissue cyst, which is the latent form
13 of the parasite [111]. In this context, many efforts are necessary to develop new drugs to treat
14 *T. gondii* infection [17].

15 **7.1. Role of autophagy in *T. gondii* infection**

16 Only a few studies on the *T. gondii* autophagic pathway have been performed, and these studies
17 suggest opposing roles of autophagy in the parasite infection [102,112]. The presence of TgAtg8
18 in autophagic vesicles was observed in tachyzoites during their intracellular replication;
19 similarly, severe parasite growth arrest due to TgAtg3 knockdown and recent identifications
20 of the presence of TgAtg1 and TgAtg4 in the parasite suggest a role for autophagy in *T.*
21 *gondii* homeostasis, although long-term exposure to autophagic stimuli was found to be
22 harmful to the parasite (Figure 7) [112; 113].

23 Tachyzoites divide by a process called endodyogeny, whereby two daughter cells are
24 developed inside a mother cell and leave residual material at the end of division. During
25 this process, autophagy might be involved in recycling the mother cell organelles, such as
26 micronemes and rhoptries, which are synthesised de novo in the daughter cells; however
27 the accumulation of organelles after endodyogeny has not been observed in TgATG3
28 knockout organisms, making other experiments necessary to confirm this hypothesis [113].
29 One important phenotype detected in autophagic mutants is the loss of mitochondrial
30 integrity [102,112]. Mitophagy, which is the autophagy of mitochondria, regulates the
31 mitochondrial number to match metabolic demand; this process represents a quality control
32 that is necessary for the removal of damaged organelles [114]. Autophagic stimuli are able
33 to direct the mitochondrial network of tachyzoites towards their autophagic pathway, but
34 the molecular machinery involved in selective targeting of the organelle remains unclear
35 [102,112]. Nutrient deprivation has been shown to be a classic stimulus for the autophagic
36 pathway activation in a large variety of organisms [37,115]. In *T. gondii* tachyzoites,
37 starvation induces autophagy in extracellular and intracellular parasites [102,112]. Further-
38 more, autophagosomes were observed in parasites after a long extracellular nutritional
39 restriction, suggesting that autophagy can act as a mechanism of resistance to starvation
40 for nutrient recycling until the infection of a new host cell [102].

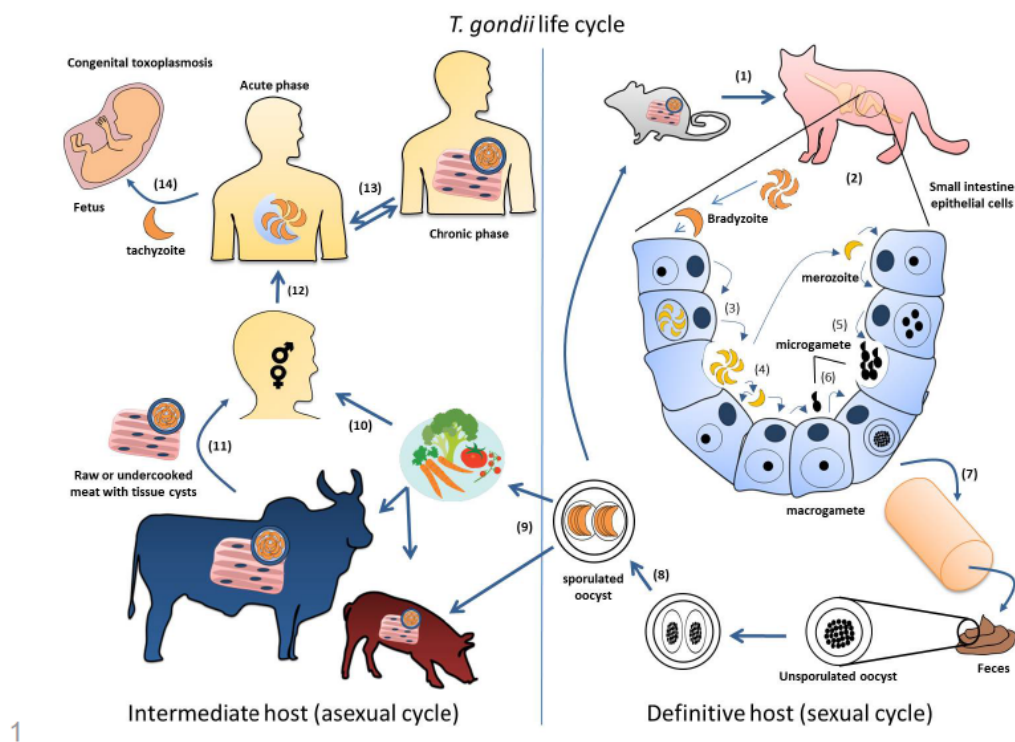


Figure 6. *T. gondii* life cycle. (1) Definitive host infection; (2) Cyst disruption and intestinal epithelial cell infection; (3) Formation of merozoites; (4,5) Start of sexual phase with the formation of macrogametes and flagellate microgametes from merozoites; (6) Fusion of microgamete and macrogamete; (7) Oocyst release to the environment in the faeces; (8) The unsporulated oocysts become infective and contaminate the environment [116-118]; (9) The sporulated oocysts can cause infection of animals via consumption of contaminated food and water. (10,11) Human infection occurs by the ingestion of raw or undercooked meat of infected animals containing *T. gondii* cysts; (12) *T. gondii* tachyzoite multiplication in the intermediate host; (13) Tachyzoite-bradyzoite differentiation and formation of tissue cysts; (14) Transplacental transmission of tachyzoites.

The data presented here demonstrate possible functions of *T. gondii* autophagy in parasite homeostasis. However, it has been proposed that, when strongly induced, the autophagic pathway represents a self-destructive mechanism leading to protozoal death. The molecular pathway of autophagic cell death is still unknown, and it is debated whether the pathway is a type of programmed cell death or a survival response to death stimuli [119]. Intracellular starved tachyzoites showed systematic mitochondrial fragmentation and a defect in host cell internalisation. As *T. gondii* is an obligate intracellular protozoa, the loss of invasion capacity leads to parasite death. The impairment in infective ability was related to the loss of mitochondrial integrity because organelles from apical complexes, such as rhoptries and micronemes, which are usually associated with the invasion process, are intact in these parasites [112]. Interestingly, these authors also demonstrated that autophagic inhibitor 3-methylade-

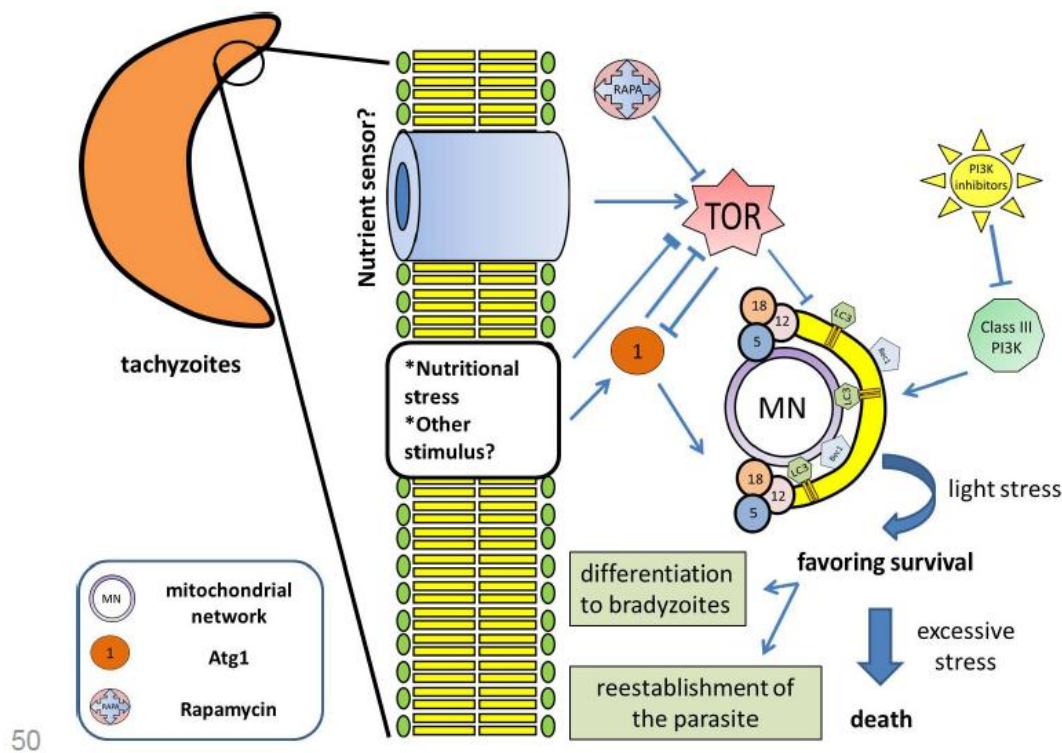


Figure 7. *T. gondii* tachyzoites response to autophagic stress. Autophagy acts in survival or death mechanisms in asexual parasites depending on the environmental stress conditions. Arrows: activation; Headless arrows: inhibition.

- 1 nine prevented mitochondrial fragmentation, suggesting autophagic involvement in *T.*
 2 *gondii* death.
- 3 While nutritional stress has been extensively used as a model for autophagy, this condition is
 4 not easily encountered in the host cells and tissues *in vivo*. However, parasites could be exposed
 5 to nutritional restriction in the extracellular environment. The viability of tachyzoites kept in
 6 an axenic medium for periods of up to 12 hours drastically decreases, but a significant number
 7 of parasites nevertheless differentiate into bradyzoites [120]. Indeed, these observations raise
 8 the hypothesis that autophagy could be an adaptive mechanism of *T. gondii* to survive for short
 9 periods in starvation conditions, allowing the parasite to recover when favourable conditions
 10 occur or even to differentiate into a cystic form. Another interesting point for discussion is the
 11 correlation between mitochondrial fragmentation in intracellular tachyzoites and the depletion
 12 of amino acids in the culture medium [112]. Activated macrophages infected with the
 13 parasite showed low availability of the essential amino acid tryptophan, a condition that
 14 directly contributes to the protozoa's death in these cells [121,122]. In this context, TOR kinase
 15 is a vital component of the amino acid sensing mechanism in eukaryotic cells, as suggested by

1 the detection of TgTOR by bioinformatic approaches and the evaluation of the activity of the
2 classical TOR inhibitor rapamycin. This inhibitor triggered mitochondrial fragmentation of
3 intracellular tachyzoites in starved parasites, and this phenotype was reversed by adding 3-
4 methyladenine [112].

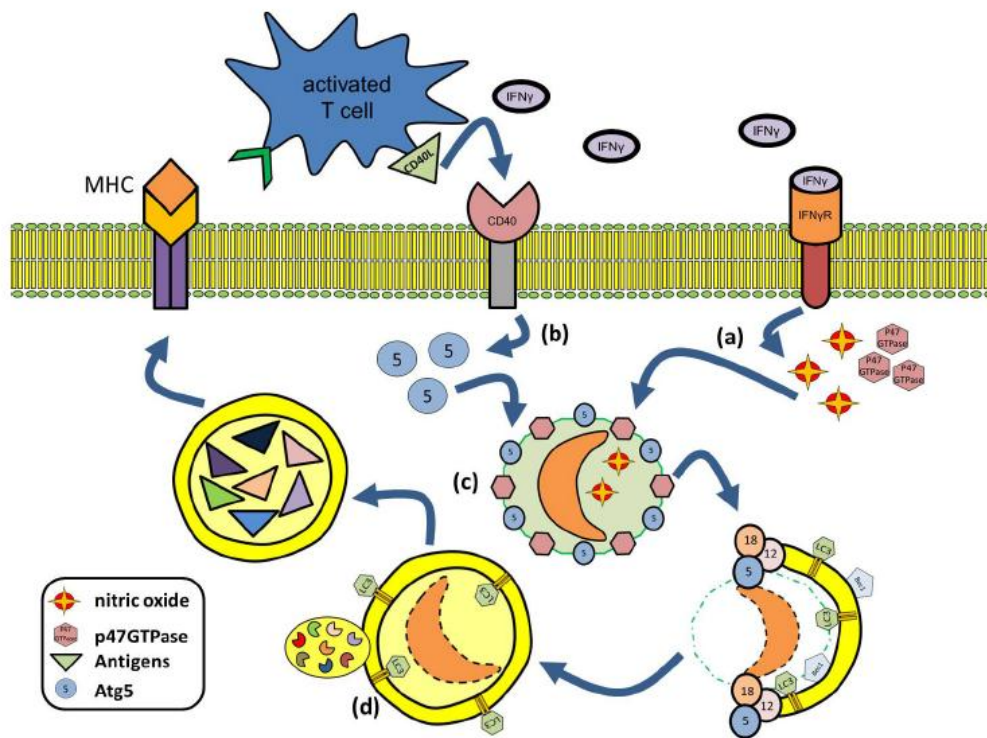
5 7.2. Host cell autophagy and *T. gondii* infection

6 As previously mentioned, *T. gondii* can infect any nucleated cell, but the parasite tropism
7 principally involves nervous and muscular cells where the establishment of cystic forms is
8 observed in chronic toxoplasmosis [111,123]. As was observed for *T. cruzi*-host cell interactions,
9 controversial data on the importance of autophagy during *T. gondii* infection have been
10 described in the literature; indeed, it has been suggested that autophagy can either control or
11 facilitate parasite internalisation and proliferation [32,35,124-128]. Despite the relevance of
12 muscular and nervous cells for the establishment of infection and for the course of the disease,
13 very little has been reported on the role of autophagy in the progression of infection. As we
14 will discuss in the next paragraphs, previous studies on the connection between the autophagic
15 pathway and *T. gondii* infection were performed in macrophages, which are cells that play an
16 important role in the immune response against this parasite [129].

17 Previous reports have shown that cellular immunity mediated by CD40 stimulation redirects
18 the *T. gondii* to a lysosomal compartment via the autophagic route, resulting in the antimicro-
19 bial activity of the macrophage *in vitro* and *in vivo* [124,125]. *In vivo*, parasite elimination was
20 dependent on GTPase p-47, IFN- γ , IGTP, and PI3K and culminated in the rupture of the
21 parasite's membrane [125] (Figure 8). Additionally, the relationship between autophagy and
22 the fusion of lysosomes with the *T. gondii* PV seems to be dependent on the synergy between
23 TRAF6 signalling downstream of CD40 and TNF- α [126]. However, the IFN- γ /p47 GTPase-
24 dependent elimination of the parasite by macrophages is independent of CD40/TNF signalling
25 *in vitro*, demonstrating the primary role of IFN- γ in immunity against *T. gondii* in mice [127].
26 As observed in astrocytes, autophagy is activated to eliminate intracellular parasite debris and
27 thus prevent the host cell death. Investigations in macrophages also indicated that the CD40-
28 p21-Beclin 1 pathway is a CD40-dependent immunity route to mediating *in vivo* protection
29 [128]. Similarly, Atg5 is required for damage to the PV membrane and removal of the parasite
30 in primary macrophages stimulated by IFN- γ , despite the fact that no autophagosomes
31 involving *T. gondii* have been detected. Atg5 also appeared crucial for *in vivo* p47 GTPase IIGP1
32 recruitment to the vacuole membrane induced by IFN- γ , suggesting an additional autophagy-
33 independent role for Atg5 in the GTPase trafficking process [32]. In *T. gondii* infected astrocytes,
34 the participation of autophagy has been shown to be indirect. The IFN- γ -stimulation of
35 astrocytes infected with tachyzoites triggers the recruitment of p47 GTPases to the PV and
36 usually leads to rupture of the vacuole and parasite membrane. In this case, autophagy acts
37 by removing protozoal debris that accumulates in the cytoplasm and causes cell injury.
38 Additionally, autophagy assists in antigen presentation through MHC class II in astrocytes,
39 allowing an intracerebral immune response to parasite [130].

40 So far, little has been described regarding the involvement of autophagy in the interaction of
41 *T. gondii* with nonprofessional phagocytes. In primary fibroblasts or HeLa cells, infection with

1 tachyzoites induced LC3 conjugation to PE, accumulation of LC3-containing vesicles close to
 2 the PV and an overexpression of beclin-1 and phosphatidylinositol-3-phosphate in the host
 3 cells in the mTOR-independent pathway. The infection of Atg5-deficient fibroblasts was
 4 reduced in physiological concentrations of amino acids, reinforcing the host cell autophagic
 5 role in the recovery of nutrients by the parasite. Because the classical function of autophagy
 6 involves recycling of various cellular components and because *T. gondii* depends on the uptake
 7 of many nutrients from the host cell, it has been proposed that the parasite may take advantage
 8 of the mammalian autophagic machinery to achieve successful infection [35]. Table 2 shows
 9 the host autophagic roles during *T. gondii* infection.



10

11 **Figure 8.** Autophagic role in *T. gondii* interaction with professional phagocytic cells. (a) INF- γ recruits P47GTPases to
 12 the PV membrane and induce nitric oxide production which limits the parasite replication. (b) CD40L activates Atg5
 13 and recruits the autophagic machinery to the PV membrane. (c) PV and parasite membrane degradation by
 14 P47GTPase and Atg5. (d) Elimination of *T. gondii* debris by autophagolysosomal fusion and possible contribution
 15 of this process in antigen presentation through class II MHC.

Host cell	Induction	Phenotype	Reference
Peritoneal Macrophages and RAW264.7 lineage	CD40 stimulation and rapamycin	accumulation of LC3 around PV and low parasite load	[124]
Peritoneal macrophages	INF- γ stimulation	autophagy- dependent elimination of intracellular parasite debris	[125]
Peritoneal macrophages	INF- γ stimulation	Atg5-dependent PV membrane disruption	[32]
bone marrow Macrophages	CD40-p21-Beclin 1 pathway	stimulation of autophagy for protection against <i>T. gondii</i>	[128]
astrocytes	INF- γ stimulation	<i>T. gondii</i> debris removal by autophagy after vacuole and parasite membrane rupture by p47 GTPases	[130]
primary fibroblasts and HeLa cells	<i>T. gondii</i> infection	Induction of LC3 conjugation to PE, accumulation of vesicles containing LC3 close to PV, beclin-1 and PI3K inside the cell	[35]

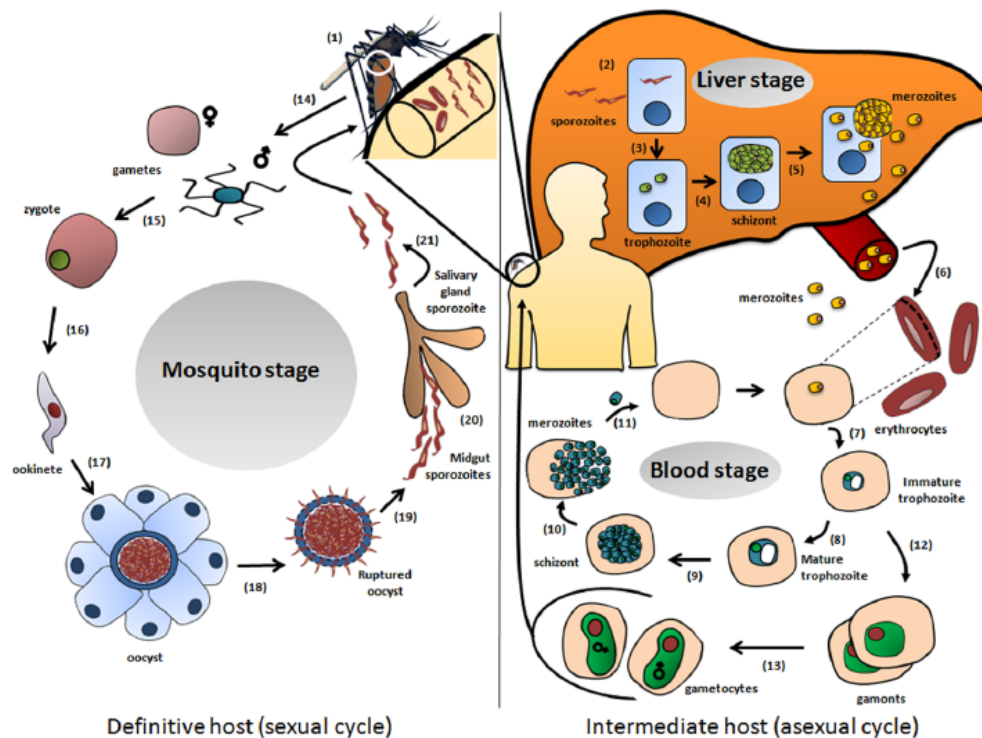
1 **Table 2.** Autophagy in *T. gondii*-host cell interactions

2 **8. *Plasmodium* sp.**

3 *Plasmodium* species are causative agents of malaria, the illness with the highest morbidity rate
4 among human parasitic diseases. Currently, 5 species of *Plasmodium* sp. (*P. falciparum*, *P.*
5 *vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi*) can infect humans, and lethality is associated with
6 *P. falciparum* [131-133]. Sporozoites are transmitted by *Anopheles* sp. mosquitoes (definitive
7 hosts) to the mammals (intermediate hosts), where they migrate primarily to the liver. After
8 internalisation in hepatocytes, the parasites convert from elongated sporozoites (invasion
9 competent and motile) to round proliferative trophozoites (metabolically active), which start
10 the asexual reproduction process known as schizogony. At the end of the reproductive process,
11 the daughter cells (merozoites) initiate maturation for erythrocyte invasion. When the
12 merozoites become mature, they are enclosed in a membrane (the merosome) and released
13 from hepatocytes to invade red blood cells, causing clinical symptoms of malaria (Figure 9).
14 [135-137].

15 **8.1. Role of autophagy in *Plasmodium* sp. infection**

16 Recent publications have suggested that autophagy is involved in the differentiation of
17 sporozoites to merosomes in hepatocytes [137,138]. The sporozoite-to-trophozoite differentia-
18 tion is accompanied by the elimination of organelles unnecessary for schizogony and the
19 production of merozoites in liver cells [137]. For example, micronemes and rhoptries are
20 compartmentalised in the cytoplasm of sporozoites and sequestered in double-membrane
21 structures resembling autophagosomes. In axenic conditions, the treatment of parasites with
22 3-methyladenine resulted in significant delay of the sporozoite differentiation process [139].



30

31 **Figure 9.** *Plasmodium* sp. life cycle. (1) Inoculation of sporozoites by malaria-infected female *Anopheles* mosquito into
 32 the human host. (2) Sporozoites infect hepatocytes. (3) Sporozoite-trophozoite differentiation. (4) Schizont formation.
 33 (5) Schizont rupture and release of merozoites. (6) Merozoites infect red blood cells. (7,8) Trophozoite maturation. (9)
 34 Schizont formation in red blood cells. (10) Schizont rupture and release of merozoites. (11) Infection of new red blood
 35 cells by the merozoites. (12,13) Differentiation of some parasites in gametocytes (sexual erythrocytic stages). (14) In-
 36 gestion of gametocytes by the mosquito during a blood meal. (15) Zygote formation in the mosquito's stomach when
 37 the microgametes penetrate the macrogametes. (16) Zygote-ookinete differentiation. (17) Ookinetes invade the
 38 midgut wall of the mosquito where they develop into oocysts. (18,19) Oocysts rupture and release sporozoites. (20)
 39 Sporozoites migrate to the mosquito's salivary glands. (21) Mosquito inoculates sporozoites into a new human, per-
 40 petuating the parasite cycle.

1 After sporozoite differentiation, Atg8 is present in autophagosomes during the replication
 2 phase, suggesting an additional independent role for this protein in autophagy [137, 138,140].

3 The involvement of autophagy in *Plasmodium*-infected red blood cells has been poorly studied.
 4 One study demonstrated that erythrocytes infected with *P. falciparum* trophozoites and
 5 maintained in supplemented culture medium expressed Atg8 in the parasite cytosol. However,
 6 when these infected cells are submitted to restriction of glucose and amino acids, an increase
 7 in the number of autophagosomes labelled by Atg8 was observed, and these vesicles were
 8 found close to red blood cell membranes. Once erythrocytes no longer have organelles in the
 9 cytoplasm, the potential targets of autophagosomes in this cell model are debated. One
 10 hypothesis suggested that these autophagosomes target haemoglobin and blood nutrients to

1 favour nutrient uptake by the parasite (Gaviria and colleagues, unpublished results). Surpris-
2 ingly, no TOR ortholog was found in the *P. falciparum* genome (Sinai & Roepe, unpublished
3 results), suggesting that under normal growth conditions, *P. falciparum* autophagy is config-
4 ured as a survival process that is constitutively regulated by the acquisition of nutrients,
5 although this route is unusual. Table 3 summarises the published reports on autophagic
6 features in apicomplexans.

7 Little is known about the involvement of autophagy in the *Plasmodium sp.*-host cell interactions.
8 So far, *Plasmodium ATG8* knock-out resulted in a lethal phenotype, indicating that this gene is
9 essential for the mammalian life-stage of the parasite [22]. However, there have been no studies
10 on the importance of the host cell autophagic machinery during the infection.

Parasite	Localisation	Induction	Phenotype	Reference
	extracellular	Amino acid starvation	Basal: maintenance of life	[102]
<i>T. gondii</i>	intracellular	Amino acid starvation and rapamycin	mitochondrial fragmentation	[111]
		Glucose and/or pyruvate starvation	Arrested mitochondrial fragmentation	
<i>Plasmodium sp.</i>	intracellular	sporozoite to trophozoite conversion in the liver	recycling of secretory organelles	[136]

11 **Table 3.** Autophagy in Apicomplexan parasites

12 9. Conclusion

13 The present chapter addresses the positive and negative regulations of the autophagic process
14 of infected mammalian cells and the possible effects of these regulations on the *in vitro* and *in*
15 *vivo* modulation of this process. This review also describes the autophagy pathway in patho-
16 genic trypanosomatids and apicomplexans responsible for some of the most relevant neglected
17 illnesses worldwide. The pivotal role of autophagy in pathogenicity and virulence was
18 demonstrated in *T. cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania sp.*, *T. gondii* and *Plasmodium sp.*, which
19 suggests that autophagic machinery is a possible target for anti-parasitic intervention.

20 Acknowledgements

21 This work was supported with grants from CNPq (Universal), FAPERJ (APQ1) and IOC/
22 FIOCRUZ.

1 Author details

2 Thabata Lopes Alberto Duque**1,2, Xênia Macedo Souto**1,3, Valter Viana de Andrade-Neto⁴,
3 Vítor Ennes-Vidal⁵ and Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto^{1*}

4 *Address all correspondence to: rubemb@ioc.fiocruz.br

5 1 Laboratory of Cell Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Ja-
6 neiro, RJ, Brazil

7 2 Laboratory of Cell Biology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora,
8 MG, Brazil

9 3 Laboratory of Structural Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio
10 de Janeiro, RJ, Brazil

11 4 Laboratory of Biochemistry of Trypanosomatids, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz
12 Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

13 5 Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo
14 Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

15 **These authors equally contributed to this work

16 References

17 [1] Nayyar GML, Breman JG, Newton PN, Herrington J. Poor-quality antimalarial drugs
18 in southeast Asia and sub-Saharan Africa. *Lancet Infectious Diseases* 2012;12(6):
19 488-96.

20 [2] Soeiro MN, De Castro SL. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic ap-
21 proaches. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2009;13(1):105-21.

22 [3] Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and
23 treatment. *Current Medicinal Chemistry* 2012;19(10): 1443-74.

24 [4] Welburn SC, Maudlin I. Priorities for the elimination of sleeping sickness. *Advances*
25 *in Parasitology* 2012;79:299-337.

26 [5] Centers for Disease Control and Prevention. Toxoplasmosis. [http://www.cdc.gov/
27 parasites/toxoplasmosis/](http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/) (accessed 17 october 2012).

28 [6] World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected
29 tropical diseases - First WHO report on neglected tropical diseases. Switzerland.
30 2010.

- 1 [7] Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genet-
2 ic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans.
3 *Advances in Parasitology* 2007;64:1-109.
- 4 [8] Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, et al. Kinetoplastids:
5 related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation*
6 2008;118(4): 1301-10.
- 7 [9] Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, et al. Ma-
8 laria: progress, perils, and prospects for eradication. *Journal of Clinical Investigation*
9 2008;118(4): 1266-76.
- 10 [10] Boyle JP, Radke JR. A history of studies that examine the interactions of *Toxoplasma*
11 with its host cell: Emphasis on in vitro models. *International Journal of Parasitology*
12 2009;39(8): 903-14.
- 13 [11] Teixeira AR, Gomes C, Lozzi SP, Hecht MM, Rosa AeC, Monteiro PS, et al. Environ-
14 tment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health. *Cadernos de*
15 *Saúde Pública* 2009;25 (1): S32-44.
- 16 [12] Nwaka S, Hudson A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature*
17 *Reviews Drug Discovery* 2006;5(11): 941-55.
- 18 [13] Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropi-
19 cal diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and dis-
20 tribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Neglected Tropical*
21 *Diseases* 2008;2(9):e300.
- 22 [14] Le Pape P. Development of new antileishmanial drugs--current knowledge and fu-
23 ture prospects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2008;23(5):
24 708-18.
- 25 [15] Nissapatorn V, Sawangjaroen N. Parasitic infections in HIV infected individuals: di-
26 agnostic & therapeutic challenges. *The Indian Journal of Medical Research*
27 2011;134(6): 878-97.
- 28 [16] Hotez PJ, Savioli L, Fenwick A. Neglected tropical diseases of the Middle East and
29 North Africa: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control.
30 *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2012;6(2):e1475.
- 31 [17] Lindoso JA, Lindoso AA. Neglected tropical diseases in Brazil. *Revista do Instituto*
32 *de Medicina Tropical de São Paulo* 2009;51(5): 247-53.
- 33 [18] Feasey N, Wansbrough-Jones M, Mabey DC, Solomon AW. Neglected tropical dis-
34 eases. *British Medical Bulletin* 2010;93: 179-200.
- 35 [19] World Health Organization. http://www.who.int/neglected_diseases/en/ access in
36 November 8, 2012.
- 37 [20] Montoya JG, Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363(9425): 1965-76.

- 1 [21] Kiel JAKW. Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philosophical Transactions of the*
2 *Royal Society* 2010;365: 819-830.
- 3 [22] Brennand A, Gualdrón-López M, Coppens I, Rigden DJ, Ginger ML, Michels PAM.
4 Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets. *Molecular and Bi-*
5 *ochemical Parasitology* 2011;177 (2): 83-99.
- 6 [23] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *Clinical Investigation*
7 2005;115(10):2679-88.
- 8 [24] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome
9 formation. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 2011; 27: 107-32.
- 10 [25] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*
11 2011;469(7330): 323-35.
- 12 [26] Sumpter R, Levine B. Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tun-
13 ing. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2010;21(7): 699-711.
- 14 [27] Kuballa P, Nolte WM, Castoreno AB, Xavier RJ. Autophagy and the immune system.
15 *Annual Review of Immunology* 2012;30: 611-46.
- 16 [28] Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy
17 is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in in-
18 fected macrophages. *Cell*. 2004;119(6): 753-66.
- 19 [29] Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host &*
20 *Microbe* 2009;5(6): 527-49.
- 21 [30] Skendros P, Mitroulis I. Host cell autophagy in immune response to zoonotic infec-
22 tions. *Clinical & Development Immunology* 2012;2012: 91052. doi:
23 10.1155/2012/910525. (accessed 17 October 2012).
- 24 [31] Picazarri K, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Autophagy during proliferation and encys-
25 tation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Infection & Immunity*.
26 2008;76(1): 278-88.
- 27 [32] Zhao Z, Fux B, Goodwin M, Dunay IR, Strong D, Miller BC, et al. Autophagosome-
28 independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity
29 to intracellular pathogens. *Cell host and Microbe* 2008;4(5): 458-69.
- 30 [33] Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, et al. Induc-
31 tion of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in
32 BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes and Infection* 2009;11(2): 181-90.
- 33 [34] Romano PS, Arboit MA, Vázquez CL, Colombo MI. The autophagic pathway is a key
34 component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell.
35 *Autophagy* 2009;5(1): 6-18.

- 1 [35] Wang Y, Weiss LM, Orlofsky A. Host cell autophagy is induced by *Toxoplasma gondii*
2 and contributes to parasite growth. *The Journal of biological chemistry* 2009;284(3):
3 1694-1701.
- 4 [36] Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdrón-López M, Colombo MI, et al. Au-
5 topophagy in protists. *Autophagy*. 2011;7(2): 127-58.
- 6 [37] Alvarez VE, Kosec G, Sant'Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B. Autophagy is in-
7 volved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *The*
8 *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(6): 3454-64.
- 9 [38] Besteiro S, Williams RA, Morrison LS, Coombs GH, Mottram JC. Endosome sorting
10 and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *The*
11 *Journal of Biological Chemistry* 2006;281(16): 11384-96.
- 12 [39] Saraiva EM, Pimenta PF, Brodin TN, Rowton E, Modi GB, Sacks DL. Changes in lipo-
13 phosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania*
14 *major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*. 1995;111 (Pt 3): 275-87.
- 15 [40] Nolan DP, Rolin S, Rodriguez JR, Van Den Abbeele J, Pays E. Slender and stumpy
16 bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* display a differential response to extracellu-
17 lar acidic and proteolytic stress. *European Journal of Biochemistry* 2000;267(1): 18-27
- 18 [41] Gonçalves RL, Barreto RF, Polycarpo CR, Gadelha FR, Castro SL, Oliveira MF. A
19 comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream
20 trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*
21 2011;43(6): 651-61.
- 22 [42] Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES. *Trypano-*
23 *soma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus*
24 gut and is crucial for parasite survival and development. *PLoS One*. 2012;7(5):e36591.
- 25 [43] Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, et
26 al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*
27 2005;309(5733): 416-22.
- 28 [44] El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al.
29 The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Sci-*
30 *ence* 2005;309(5733): 409-15.
- 31 [45] Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The
32 genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005;309(5733):
33 436-42.
- 34 [46] Rigden DJ, Herman M, Gillies S, Michels PA. Implications of a genomic search for
35 autophagy-related genes in trypanosomatids. *Biochemical Society Transactions*
36 2005;33(Pt 5): 972-4.

- 1 [47] Herman M, Gillies S, Michels PA, Rigden DJ. Autophagy and related processes in
2 trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy*
3 2006;2(2): 107-18.
- 4 [48] Hidron A, Vogenthaler N, Santos-Preciado JI, Rodriguez-Morales AJ, Franco-Paredes
5 C, Rassi A. Cardiac involvement with parasitic infections. *Clinical Microbiology Re-*
6 *views* 2010;23(2): 324-49.
- 7 [49] Brown RC, Evans DA, Vickerman K. Developmental changes in ultrastructure and
8 physiology of *Trypanosoma brucei*. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine*
9 *Hygiene* 1972;66(2): 336-7.
- 10 [50] Vickerman K, Tetley L. Recent ultrastructural studies on trypanosomes. *Annales de*
11 *la Société Belge de Médecine Tropicale* 1977;57(4-5): 441-57.
- 12 [51] Herman M, Pérez-Morga D, Schtickzelle N, Michels PA. Turnover of glycosomes
13 during life-cycle differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Autophagy* 2008;4(3): 294-308.
- 14 [52] Barquilla A, Crespo JL, Navarro M. Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by
15 preventing TOR complex 2 formation. *Proceedings of National Academy of Sciences*
16 *U S A* 2008;105(38): 14579-84.
- 17 [53] Koopmann R, Muhammad K, Perbandt M, Betzel C, Duszenko M. *Trypanosoma brucei*
18 ATG8: structural insights into autophagic-like mechanisms in protozoa. *Autophagy*
19 2009;5(8): 1085-91.
- 20 [54] Li FJ, Shen Q, Wang C, Sun Y, Yuan AY, He CY. A role of autophagy in *Trypanosoma*
21 *brucei* cell death. *Cellular Microbiology* 2012;14(8): 1242-56.
- 22 [55] Uzcátegui NL, Carmona-Gutiérrez D, Denninger V, Schoenfeld C, Lang F, Figarella
23 K, et al. Antiproliferative effect of dihydroxyacetone on *Trypanosoma brucei* blood-
24 stream forms: cell cycle progression, subcellular alterations, and cell death. *Antimi-*
25 *crobial Agents and Chemotherapy* 2007;51(11): 3960-8.
- 26 [56] Uzcátegui NL, Denninger V, Merkel P, Schoenfeld C, Figarella K, Duszenko M. Dihy-
27 droxyacetone induced autophagy in African trypanosomes. *Autophagy* 2007;3(6):
28 626-9.
- 29 [57] Merkel P, Beck A, Muhammad K, Ali SA, Schönfeld C, Voelter W, et al. Spermine
30 isolated and identified as the major trypanocidal compound from the snake venom
31 of *Eristocophis macmahoni* causes autophagy in *Trypanosoma brucei*. *Toxicon* 2007;50(4):
32 457-69.
- 33 [58] Delgado M, Anderson P, Garcia-Salcedo JA, Caro M, Gonzalez-Rey E. Neuropepti-
34 des kill African trypanosomes by targeting intracellular compartments and inducing
35 autophagic-like cell death. *Cell Death and Differentiation* 2009;16(3): 406-16.

- 1 [59] Denninger V, Koopmann R, Muhammad K, Barth T, Bassarak B, Schönfeld C, et al.
2 Kinetoplastida: model organisms for simple autophagic pathways? *Methods in Enzy-*
3 *mology* 2008;451: 373-408.
- 4 [60] Zhang Y, Qi H, Taylor R, Xu W, Liu LF, Jin S. The role of autophagy in mitochondria
5 maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S.*
6 *cerevisiae* strains. *Autophagy* 2007;3(4): 337-46.
- 7 [61] Chen Y, Gibson SB. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger
8 for autophagy? *Autophagy* 2008;4(2): 246-8.
- 9 [62] Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and path-
10 ology. *Trends in Biochemical Sciences* 2011;36(1): 30-8.
- 11 [63] Braga MV, Magaraci F, Lorente SO, Gilbert I, de Souza W. Effects of inhibitors of Del-
12 ta24(25)-sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes of *Trypano-*
13 *soma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis* 2005;11(6): 506-15.
- 14 [64] Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL. Anti-proliferative syner-
15 gy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Ki-
16 netoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *The Journal of*
17 *Antimicrobial Chemotherapy* 2005;55(5): 780-4.
- 18 [65] Menna-Barreto RF, Corrêa JR, Pinto AV, Soares MJ, de Castro SL. Mitochondrial dis-
19 ruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles
20 synthesized from beta-lapachone. *Parasitology Research* 2007;101(4): 895-905.
- 21 [66] Menna-Barreto RF, Corrêa JR, Cascabulho CM, Fernandes MC, Pinto AV, Soares MJ,
22 et al. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*.
23 *Parasitology* 2009;136(5): 499-510.
- 24 [67] Fernandes MC, Da Silva EN, Pinto AV, De Castro SL, Menna-Barreto RF. A novel tri-
25 azolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of
26 mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 2012;139(1): 26-36.
- 27 [68] Veiga-Santos P, Barrias ES, Santos JF, de Barros Moreira TL, de Carvalho TM, Urbina
28 JA, et al. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of
29 *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2012;40(1): 61-71.
- 30 [69] Menna-Barreto RF, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, et
31 al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultra-
32 structural study. *Micron* 2009;40(2): 157-68.
- 33 [70] DaRocha WD, Otsu K, Teixeira SM, Donelson JE. Tests of cytoplasmic RNA interfer-
34 ence (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Try-*
35 *panosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2004;133(2): 175-86.
- 36 [71] Sandes JM, Borges AR, Junior CG, Silva FP, Carvalho GA, Rocha GB, et al. 3-Hy-
37 droxy-2-methylene-3-(4-nitrophenyl)propanenitrile: A new highly active compound

- 1 against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. Bioorganic
2 Chemistry 2010;38(5): 190-5.
- 3 [72] Benítez D, Pezaroglo H, Martínez V, Casanova G, Cabrera G, Galanti N, et al. Study
4 of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell death by NMR-visible mobile lipid analysis.
5 Parasitology 2012 139(4): 506-15.
- 6 [73] Soares MJ, Souto-Padrón T, De Souza W. Identification of a large pre-lysosomal com-
7 partment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. Journal of Cell Science
8 1992;102 (Pt 1): 157-67.
- 9 [74] Soares MJ. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the
10 endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. Memórias do Instituto Oswaldo
11 Cruz 1999;94 (1): 139-41.
- 12 [75] Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimasti-
13 gotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress.
14 The Journal of Parasitology 2000;86(6): 1213-8.
- 15 [76] Alvarez VE, Kosec G, Sant Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B. Blocking autophagy
16 to prevent parasite differentiation: a possible new strategy for fighting parasitic in-
17 fections? Autophagy 2008;4(3): 361-3
- 18 [77] Braga MV, de Souza W. Effects of protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase
19 inhibitors on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiology
20 Letters 2006;256(2): 209-16.
- 21 [78] Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of
22 phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control mac-
23 roautophagy in HT-29 cells. The Journal of Biological Chemistry. 2000; 275(2): 992-8.
- 24 [79] Romano PS, Cueto JA, Casassa AF, Vanrell MC, Gottlieb RA, Colombo MI. Molecular
25 and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay.
26 IUBMB Life 2012;64(5): 387-96.
- 27 [80] Martins RM, Alves RM, Macedo S, Yoshida N. Starvation and rapamycin differential-
28 ly regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacy-
29 clic forms. Cellular Microbiology 2011;13(7): 943-54.
- 30 [81] Maeda FY, Alves RM, Cortez C, Lima FM, Yoshida N. Characterization of the infec-
31 tive properties of a new genetic group of *Trypanosoma cruzi* associated with bats. Acta
32 Tropica 2011;120(3): 231-7.
- 33 [82] Bera A, Singh S, Nagaraj R, Vaidya T. Induction of autophagic cell death in *Leishma-*
34 *nia donovani* by antimicrobial peptides. Molecular and Biochemical Parasitology
35 2003;127(1): 23-35.

- 1 [83] Dos Santos AO, Veiga-Santos P, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Sudatti DB, Bianco
2 EM, et al. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania*
3 *amazonensis*. *Marine Drugs* 2010;8(11): 2733-43.
- 4 [84] Santos AO, Santin AC, Yamaguchi MU, Cortez LE, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho
5 BP, et al. Antileishmanial activity of an essential oil from the leaves and flowers of
6 *Achillea millefolium*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2010;104(6): 475-83.
- 7 [85] Schurigt U, Schad C, Glowa C, Baum U, Thomale K, Schnitzer JK, et al. Aziridine-2,3-
8 dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in *Leishmania*
9 major associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like va-
10 cuoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010;54(12): 5028-41.
- 11 [86] de Macedo-Silva ST, de Oliveira Silva TL, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JC. An-
12 tiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promasti-
13 gote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. *Molecular Biology*
14 *International* 2011; doi: 10.4061/2011/876021 (accessed 17 October 2012).
- 15 [87] Monte Neto RL, Sousa LM, Dias CS, Barbosa Filho JM, Oliveira MR, Figueiredo RC.
16 Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by
17 yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. *Experimental Parasitology*
18 2011;127(1):215-21.
- 19 [88] Sengupta S, Chowdhury S, Bosedasgupta S, Wright CW, Majumder HK. Cryptole-
20 pine-Induced Cell Death of *Leishmania donovani* Promastigotes Is Augmented by In-
21 hibition of Autophagy. *Molecular Biological International* 2011;2011: 187850.
- 22 [89] Silva AL, Adade CM, Shoyama FM, Neto CP, Padrón TS, de Almeida MV, et al. In
23 vitro leishmanicidal activity of N-dodecyl-1,2-ethanediamine. *Biomedicine and Phar-*
24 *macotherapy* 2012;66(3): 180-6.
- 25 [90] Williams RA, Tetley L, Mottram JC, Coombs GH. Cysteine peptidases CPA and CPB
26 are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Molecular Micro-*
27 *biology* 2006;61(3): 655-74.
- 28 [91]] Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differen-
29 tiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology* 2007;37(10): 1063-75.
- 30 [92] Bhattacharya A, Biswas A, Das PK. Identification of a protein kinase A regulatory
31 subunit from *Leishmania* having importance in metacyclogenesis through induction
32 of autophagy. *Molecular Microbiology* 2012;83(3): 548-64.
- 33 [93] Williams RAM, Woods KL, Juliano L, Mottram JC, Coombs GH. Characterisation of
34 unusual families of ATG8-like proteins and ATG12 in the protozoan parasite *Leish-*
35 *mania major*. *Autophagy* 2009;5(2): 159-172.
- 36 [94] Williams RAM, Smith TK, Cull B, Mottram JC, Coombs GH. ATG5 is Essential for
37 ATG8-Dependent Autophagy and Mitochondrial Homeostasis in *Leishmania major*.
38 *Plos Pathogens* 2012; 8 (5): 1-14.

- 1 [95] Goldshmidt H, Matas D, Kabi A, Carmi S, Hope R, Michaeli S. Persistent ER stress
2 induces the spliced leader RNA silencing pathway (SLS), leading to programmed cell
3 death in *Trypanosoma brucei*. PLoS Pathogens 2010;6(1):e1000731.
- 4 [96] Schaible UE, Schlesinger PH, Steinberg TH, Mangel WF, Kobayashi T, Russell DG.
5 Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the
6 host cell cytosol via two independent routes. Journal of Cell Science 1999;112(Pt 5):
7 681-93.
- 8 [97] Cyrino LT, Araújo AP, Joazeiro PP, Vicente CP, Giorgio S. *In vivo* and *in vitro* *Leish-*
9 *mania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages. Tissue & Cell 2012;
10 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2012.08.003> (accessed 17 October 2012).
- 11 [98] Mitroulis I, Kourtzelis I, Papadopoulos VP, Mimidis K, Speletas M, Ritis K. *In vivo*
12 induction of the autophagic machinery in human bone marrow cells during *Leishma-*
13 *nia donovani* complex infection. Parasitology International 2009;58(4):475-7.
- 14 [99] Besteiro S. Which roles for autophagy in *Toxoplasma gondii* and related apicomplexan
15 parasites? Molecular and Biochemical Parasitology 2012;184: 1-8.
- 16 [100] Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophago-
17 some formation. Molecular biology of the cell 2008;19(8): 3290-8.
- 18 [101] Shvets E, Fass E, Scherz-Shouval R, Elazar Z. The N-terminus and Phe52 residue of
19 LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes. Journal of cell science 2008;121(Pt
20 16): 2685-95.
- 21 [102] Besteiro S, Brooks CF, Striepen B, Dubremetz JF. Autophagy protein Atg3 is essential
22 for maintaining mitochondrial integrity and for normal intracellular development of
23 *Toxoplasma gondii* tachyzoites. PLoS pathogens 2011;7(12): e1002416.
- 24 [103] Diaz-Troya S, Perez-Perez ME, Florencio FJ, Crespo JL. The role of TOR in autophagy
25 regulation from yeast to plants and mammals. Autophagy 2008;4(7): 851-65.
- 26 [104] Rigden DJ, Michels PA, Ginger ML. Autophagy in protists: Examples of secondary
27 loss, lineage-specific innovations, and the conundrum of remodeling a single mito-
28 chondrion. Autophagy 2009;5(6): 784-94.
- 29 [105] Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United
30 States. International journal for parasitology 2008;38(11): 1257-78.
- 31 [106] Furtado JM, Smith JR, Belfort R Jr., Gattay D, Winthrop KL. Toxoplasmosis: a global
32 threat. Journal of global infectious diseases 2011;3(3): 281-4.
- 33 [107] Mordue DG, Hakansson S, Niesman I, Sibley, LD. *Toxoplasma gondii* resides in a va-
34 cuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking
35 pathways. Experimental parasitology 1999;92(2): 87-99.
- 36 [108] Sullivan WJ Jr., Jeffers V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency.
37 FEMS microbiology reviews 2012;36(3): 717-33.

- 1 [109] Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Toxoplasmosis - congenital and in immunocompro-
2 mised patients: a parallel. *Parasitology today* 1993;9(2): 61-3.
- 3 [110] Mele A, Paterson PJ, Prentice HG., Leoni P, Kibbler CC. Toxoplasmosis in bone mar-
4 row transplantation: a report of two cases and systematic review of the literature.
5 *Bone marrow transplantation* 2002;29(8): 691-8.
- 6 [111] Innes EA. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses and public*
7 *health* 2010;57(1): 1-7.
- 8 [112] Ghosh D, Walton JL, Roepe PD, Sinai AP. Autophagy is a cell death mechanism in
9 *Toxoplasma gondii*. *Cellular microbiology* 2012;14(4): 589-607.
- 10 [113] Besteiro S. Role of ATG3 in the parasite *Toxoplasma gondii*: Autophagy in an early
11 branching eukaryote. *Autophagy* 2012;8(3): 435-7.
- 12 [114] Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell*
13 *biology* 2011;12(1): 9-14.
- 14 [115] Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The in-*
15 *ternational journal of biochemistry and cell biology* 2004;36(12): 2445-62.
- 16 [116] Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *The Journal of protozoology*
17 1972;19(1): 155-7.
- 18 [117] Dubey JP, Frenkel JK. Experimental toxoplasma infection in mice with strains pro-
19 ducing oocysts. *The Journal of parasitology* 1973; 59(3): 505-12.
- 20 [118] Dubey JP. Feline toxoplasmosis and coccidiosis: a survey of domiciled and stray cats.
21 *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1973; 162(10): 873-7.
- 22 [119] Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent arte-
23 facts. *Cell death and differentiation* 2012;19(1): 87-95.
- 24 [120] Yahiaoui B, Dzierszinski F, Bernigaud A, Slomianny C, Camus D, Tomavo S. Isola-
25 tion and characterization of a subtractive library enriched for developmentally regu-
26 lated transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and*
27 *biochemical parasitology* 1999;99(2): 223-35.
- 28 [121] Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human
29 fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proceedings of the Na-*
30 *tional Academy of Sciences of the United States of America* 1984;81(3): 908-12.
- 31 [122] Pfefferkorn ER, Eckel M, Rebhun S. Interferon-gamma suppresses the growth of *Tox-*
32 *oplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. *Molecular*
33 *and biochemical parasitology* 1986;20(3): 215-24.
- 34 [123] Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and molecu-*
35 *lar biology reviews* 2000;64(3): 607-23.

- 1 [124] Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels MJ, Striepen B, Subauste, CS. CD40 induces
2 macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fu-
3 sion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. The Journal of clinical investi-
4 gation 2006;116(9): 2366-77.
- 5 [125] Ling Y M, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJ, et al.. Vacuolar
6 and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in
7 primed effector macrophages. The Journal of experimental medicine 2006;203(9):
8 2063-271.
- 9 [126] Subauste CS, Andrade RM, Wessendarp M. CD40-TRAF6 and autophagy-dependent
10 anti-microbial activity in macrophages. Autophagy 2007;3(3): 245-8.
- 11 [127] Zhao Y, Wilson D, Matthews S, Yap GS. Rapid elimination of *Toxoplasma gondii* by
12 gamma interferon-primed mouse macrophages is independent of CD40 signaling. In-
13 fection and immunity 2007;75(10): 4799-803.
- 14 [128] Portillo JA, Okenka G, Reed E, Subauste A, Van Grol J, Gentil K, et al. The CD40-au-
15 tophagy pathway is needed for host protection despite IFN-Gamma-dependent im-
16 munity and CD40 induces autophagy via control of P21 levels. PLoS One 2010;5(12):
17 e14472.
- 18 [129] Bogdan C, Rollinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages?
19 Parasitology Today 1999;15(1): 22-8.
- 20 [130] Halonen SK. Role of autophagy in the host defense against *Toxoplasma gondii* in astro-
21 cytes. Autophagy 2009;5(2): 268-9.
- 22 [131] Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium*
23 *knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.
24 Clinical infectious diseases 2008;46(2): 165-71.
- 25 [132] Marchand RP, Culleton R, Maeno Y, Quang NT, Nakazawa S. Co-infections of *Plas-*
26 *modium knowlesi*, *P. falciparum*, and *P. vivax* among Humans and *Anopheles dirus*
27 Mosquitoes, Southern Vietnam. Emerging infectious diseases 2011;17(7): 1232-9.
- 28 [133] William T, Menon J, Rajahram G, Chan L, Ma G, Donaldson S, et al. Severe *Plasmodi-*
29 *um knowlesi* malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia. Emerging infectious
30 diseases 2011;17(7): 1248-55.
- 31 [134] Frevert U, Engelmann S, Zougbede S, Stange J, Ng B, Matuschewski K, et al. Intravi-
32 tal observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. PLoS biology
33 2005;3(6): e192.
- 34 [135] Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative
35 imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. Nature Medicine
36 2006;12(2): 220-4.

- 1 [136] Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipu-
2 lation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids.
3 Science 2006;313(5791): 1287-90.
- 4 [137] Jayabalasingham B, Bano N, Coppens I. Metamorphosis of the malaria parasite in the
5 liver is associated with organelle clearance. Cell Research 2010; 20: 1043-1059.
- 6 [138] Coppens I. Metamorphoses of malaria: the role of autophagy in parasite differentia-
7 tion. Essays in biochemistry 2011;51: 127-36.
- 8 [139] Vaid A, Ranjan R, Smythe WA, Hoppe HC, Sharma P. PfPI3K, a phosphatidylinosi-
9 tol-3 kinase from *Plasmodium falciparum*, is exported to the host erythrocyte and is in-
10 volved in hemoglobin trafficking. Blood 2010;115(12): 2500-7.
- 11 [140] Kitamura K, Kishi-Itakura C, Tsuboi T, Sato S, Kita K, Ohta N, Mizushima N. Au-
12 tophagy-Related Atg8 Localizes to the Apicoplast of the Human Malaria Parasite
13 *Plasmodium falciparum*. Plos one 2012;7(8): 1-10.