Juliana Moraes Alvim

**Efeito da rapamicina na infecção de cardiomiócitos humanos por
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios
Genéticos de Desenvolvimento e
Metabolismo
Orientador: Dr. Alexandre da Costa
Pereira

São Paulo

2019

Juliana Moraes Alvim

**Efeito da rapamicina na infecção de cardiomiócitos humanos por
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios
Genéticos de Desenvolvimento e
Metabolismo
Orientador: Dr. Alexandre da Costa
Pereira

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Alvim, Juliana Moraes

Efeito da rapamicina na infecção de
cardiomiócitos humanos por *Trypanosoma cruzi* /
Juliana Moraes Alvim. -- São Paulo, 2019.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: Alexandre da Costa Pereira.

Descritores: 1.Cardiomiotopia chagásica
2.Células-tronco pluripotentes induzidas
3.Cardiomíocitos 4.Trypanosoma cruzi 5.Sirolimo
6.Inibidor de mTOR 7.Vacúolo parasitóforo

USP/FM/DBD-399/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

*Dedico este trabalho àquela que me deu a vida e aquele que me ensinou a vivê-la.
Valdeci Ferreira de Moraes e João Batista
Pereira Alvim.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Gabriela Venturini, por me aceitar no laboratório, me apresentar ao grupo incrível do qual fazemos parte e por toda orientação técnica, científica e pessoal que dedicou a mim nos últimos anos e que foram essenciais para a criação e desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço às demais meninas do grupo de Proteômica: Pamella Malagrino, Kallyandra Padilha, Tamiris Gois e Bianca Kiers pela amizade e companheirismo. Obrigada especialmente Gabi, Kally e Pam que participaram do começo ao fim desse projeto, por todo apoio, carinho e por todas as conversas sobre absolutamente todos os tópicos. É uma satisfação sem tamanho fazer parte de um grupo tão unido e com pessoas tão incríveis.

Agradeço ao meu orientador, Alexandre, pela confiança depositada em mim, pelas discussões científicas, pelo incentivo e pelo apoio. Agradeço também ao professor José Eduardo Krieger por ceder o laboratório com estrutura mais do que suficiente para a realização desse projeto.

Agradeço ao grupo de iPS: Agatha, por toda a simpatia e companheirismo desde que entramos no laboratório, por toda ajuda, todas as dicas e apoio; Thayane, por todo apoio quando entrei no grupo, por sempre me ajudar com as células e pelo companheirismo. Theo, obrigada por toda a ajuda com as células e os parasitas, por toda disposição, cuidado, apoio, pelos almoços e conversas; Aline e Rafael por toda disposição em ajudar em diversos momentos e pelo companheirismo; Diogo por sempre se dispor a ajudar, mesmo que de longe.

Agradeço às tantas pessoas do Laboratório que tornaram muito mais agradável o dia-a-dia e por toda ajuda técnica e científica: pessoal do grupo de Renal: Flavinha, Acaris, Renato, Daniel, Danúbia, Flávio. Grupo de Exercício Físico: Cynthia, Anna e Bruno. Grupo de Biologia Vascular: João, Thaís Girão, Miriam. Ao grupo de Genômica Funcional: Samantha, Vinicius Souza e Iguaracy; ao pessoal da Bioinfo: Silvestre, Vinícius, Victor, Ariel. À Luz Marina. Ao pessoal da genética: Leiliane, Paulo Roberto, Juliana, Carol Tosin, Emanuelle, Gabi, Isabella, Maurício. Aos técnicos: Élida, Thiago, Mariana, Mariliza, Márcio, Mari

Bozoklian, Thaís. E aos PIs: Dr. Paulo Caleb, Dra. Miriam Alaniz, Dra. Ayumi Miyakawa, Dra. Adriana Girardi, Dra. Fabiana Evangelista.

Agradeço imensamente ao Brendo, Sileide e Andrea por todo trabalho que é essencial para o perfeito funcionamento do laboratório! Às meninas da secretaria: Marcelly, Priscila, Maúde, Silvana e Julia por todo apoio técnico e burocrático. Às meninas da recepção: Ana Maria e Edinalva, pela disposição e apoio. À Renata pelo gerenciamento do laboratório e por todo esforço para tentar garantir que tenhamos um bom ambiente de trabalho.

Agradeço à Marilda e ao Ramendra por toda ajuda na cultura de *T. cruzi*, pelas dicas, a paciência, o apoio e simpatia e o carinho ao longo desses anos.

Agradeço aos técnicos responsáveis pela microscopia no CEFAP: Jô e Mário. Obrigada por todas as dicas, por toda disposição e pelo trabalho que foi essencial para gerar todas as imagens desse trabalho e consequentemente a maioria dos resultados dessa dissertação.

Não poderia deixar de agradecer à minha primeira orientadora, Marcela Sorelli, por ter me dado todo apoio, toda base científica e ética para desenvolver um projeto de pesquisa. Agradeço ao primeiro grupo do qual tive a honra de fazer parte: Mari, Karine, Carol, Fê, Mayra e Frayli. Ao professor Marcelo Christoffolette por toda ajuda na cultura de células, imunofluorescência e por sempre me instigar ao questionamento científico. Ainda, ao pessoal do Lab 502-3: Kelly, Erika, Camila, Jéssica, professora Marcella Milazzotto e professor Arnaldo.

Às minhas amigas da faculdade: Aline Reis, Amanda Faure e Letícia Reis. Obrigada pela rede de apoio que construímos após o final da faculdade, por serem um lugar seguro para o desabafo e por toda a força para seguir em frente. À Camila Nunes por todas as histórias e caronas compartilhadas na época da faculdade (brigadão dona Agda!). Agradeço também à dona Adriana Faure pelas caronas para o NAC. Falando em NAC, obrigada Fabi e pessoal do NAC por todos os ensinamentos, todo apoio na minha “carreira científica” e por sempre acreditar que as coisas dariam certo.

Aos amigos que conquistei no lugar que foi não só escola, mas também casa, e àqueles que a vida me trouxe: Airton, Camila, Fortinho, Gabi, Gui Carvalho, Gui Salvadego, Jess, Josi, Ju Kapczynski, Leonam, Lucas, Nathy, Paulo, Pati, Renan, Taci, Tata, Tevez, Victor e Vini: vocês são verdadeiros

presentes. Poder passar tantos anos aprendendo e crescendo ao lado de cada um de vocês é indescritível, obrigada por todo apoio e carinho. E aos tantos amigos que passaram pela minha vida e se permitiram ser ombro, abraço e carinho: obrigada por tudo que me ensinaram!

Ao amigo, namorado e marido, Paulo Henrique Rodrigues, obrigada por todo apoio, compreensão e força que tem me dado todos os dias. Dividir a casa, os dias e a vida com você tem sido uma alegria sem tamanho! Obrigada também à família Moro Rodrigues e seus agregados que sempre me acolheram tão bem.

Agradeço à minha família pela criação, o mimo, o apoio e a força que me ensinaram a ter e que são essenciais para o meu desenvolvimento. Principalmente à “entidade materna” que me criou, composta por minha mãe, avó e principalmente minhas tias (Tiquita, Dorinha, Raimunda, Gilda e Vanda Moraes), foi muito importante crescer com exemplos como vocês. Agradeço ao meu padrinho Gilberto por toda a presença que teve na minha vida e aos meus tios Aurelino e Valmir. Agradeço aos meus primos (Elvis, Carla, Dudu, Douglas, Wagner, Thalita, Bruno e Mariana) por toda alegria que deram à minha vida! Agradeço à Érica Spaulonci que foi minha primeira e melhor amiga, uma verdadeira irmã, por me ensinar a ser feliz. Agradeço também a toda família Carneiro Spaulonci.

Agradeço aos meus tios Joaquim e Isabel Alvim e minha prima Larissa e seu marido Aron, por toda a presença desde a infância, pelo acolhimento na época da faculdade e todo carinho que dedicaram a mim. Agradeço também às tias e aos tios (Zilá e Oswaldo, Aparecida, Nilza e Silval, Selma e Aniel, Chica e Wilson, Valdemar, Geraldino) e aos (muitos!) primos e primas paternos pelo compartilhar de histórias e momentos que me faziam sentir mais perto do meu pai.

Fica aqui o registro de todo amor, carinho e saudade que dedico ao melhor pai do mundo. Obrigada por sempre acreditar que eu seria a melhor em sei lá quantas profissões que eu dizia que iria seguir quando era criança; por ser porto seguro e um exemplo de liderança, alegria e generosidade.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desse projeto (Processo 2016/25845-1).

Epígrafe

*“Não vai demorar que passemos adiante
uma grande e bela ciência, que faz arte em
defesa da vida.”*

Carlos Chagas, 1928

Normalização adotada

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doença de Chagas.....	1
1.2. Cardiomiopatia chagásica crônica (CCC)	3
1.3. Infecção de cardiomiócitos e formação do vacúolo parasitóforo	4
1.4. Via de PI3K/AKT/mTOR.....	8
1.5. Uso de cardiomiócitos derivados de hiPSC (hiPSC-CM)	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo geral	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Cultura de células-tronco humanas de pluripotência induzida diferenciadas em cardiomiócitos (hiPSC-CM).....	15
3.2. Infecção celular com <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
3.3. Modulação da via de mTOR.....	18
3.4. Avaliação da infecção e replicação	18
3.5. Modulação e avaliação de mitofagia e autofagia por fluorescência	19
3.6. High Content Screening (HCS) e High Content Analysis (HCA)	20
3.7. Western blot	22
3.8. Análise de fluxo extracelular (Seahorse).....	23
3.9. Análise estatística	24
4. RESULTADOS	25
4.1. Cultura de hiPSC-CM e infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i>	25

4.2.	Ativação da via de mTOR após infecção e modulação com Rapamicina	26
4.3.	mTOR e vacúolo parasitóforo	32
5.	DISCUSSÃO.....	37
6.	CONCLUSÃO.....	41
7.	REFERÊNCIAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de Transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Adaptado de Argolo e colaboradores.....	2
Figura 2: Esquema de moléculas envolvidas na interação parasita-hospedeiro expressas no parasita e na célula hospedeira.	6
Figura 3: Modelo de entrada do T. <i>cruzi</i> em células não-fagocíticas	7
Figura 4: Modelo de ativação da via PI3K/AKT/mTOR.	10
Figura 5: Linha do tempo dos tratamentos realizados para diferenciação de hiPSC em hiPSC-CM.	17
Figura 6: Avaliação da infecção em hiPSC-CM.....	26
Figura 7: Expressão proteica de componentes da via de mTOR.	27
Figura 8: Expressão proteica de mTOR após tratamento com Rapamicina.....	28
Figura 9: Avaliação de infecção após modulação de mTORC1.	29
Figura 10: Dados de consumo de oxigênio.	29
Figura 11: Análise de quantidade mitocondrial utilizando hiPSC-CM com GFP ligado à TOM20.....	31
Figura 12: Análise de infecção e replicação após tratamento com CCCP.	32
Figura 13: Análise de replicação após tratamento com 3-MA ou Bafilomicina com adição de Rapamicina.	33
Figura 14: Análise de infecção e replicação após tratamento com 3-MA e Bafilomicina A1.....	34
Figura 15: Análise de infecção e presença de LAMP1 após tratamento com Bafilomicina e Rapamicina.	36

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1 - Anticorpos utilizados em Western blot.</u>	23
<u>Tabela 2: Vídeos dos cardiomiócitos apresentando contração espontânea</u>	25

LISTA DE ABREVIações

3-MA	3-metiladenina
4E-BP1	Proteína 1 de ligação a 4E
7-AAD	7-aminoactinomycin D
AKT	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	do inglês <i>bicinchoninic Acid</i>
BSA	do inglês <i>bovin serum albumin</i>
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CCCP	do inglês <i>carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone</i>
CDM5	meio de cultura composto de RPMI, albumina, ácido ascórbico, antioxidante e aminoácidos
cDNA	DNA complementar
CEFAP	Centro de Facilidades para a Pesquisa
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CSV	do inglês <i>comma separated values</i>
DAPI	Diaminofenilidol
DMSO	Dimetilsulfóxido
E8	Meio de cultura. Do inglês <i>Essential 8</i>
ECL	do inglês <i>enhanced chemilluminescence</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América

FBS	do inglês <i>fetal bovin serum</i>
FKBP12	do inglês <i>FK506-binding protein 12</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GE	do inglês <i>General Electric</i>
GFP	do inglês <i>green fluorescent protein</i>
GSK3	do inglês <i>Glycogen synthase kinase-3</i>
HCA	do inglês <i>High Content Analysis</i>
HCS	do inglês <i>High Content Screening</i>
HIF-1 α	do inglês <i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
hiPSC	do inglês <i>human induced pluripotent stem cells</i>
hiPSC-CM	do inglês <i>human induced pluripotent stem cells derived cardiomyocytes</i>
Hpi	Horas pós-infecção
HRP	do inglês <i>horseradish peroxidase</i>
ICB-IV	Instituto de Ciência Biomédicas IV
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
Incor	Instituto do Coração
IP3	do inglês <i>Inositol-1,4,5-trisphosphate</i>
LAMP	do inglês <i>lysosome-associated membrane protein</i>
LDL	do inglês <i>Low Density Lipoproteins</i>
LGCM	Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular
mEGFP	do inglês <i>monomeric enhanced green fluorescent protein</i>
mLST8	do inglês <i>mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>

MOI	do inglês <i>multiplicity of infection</i>
MT	Tripomastigota metacíclico
mTORdo	inglês <i>mammalian/mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	do inglês <i>mammalian/mechanistic target of rapamycin</i>
<i>complex 1</i>	
mTORC2	do inglês <i>mammalian/mechanistic target of rapamycin</i>
<i>complex 2</i>	
OCR	do inglês <i>oxygen consumption rate</i>
PCR	do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PBS	do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS com adição de Tween-20
PDK1	do inglês <i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1</i>
PFA	Paraformaldeído
PH	do inglês <i>pleckstrin homology</i>
PI3K	do inglês <i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
PIP2	do inglês <i>phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate</i>
PIP3	do inglês <i>phosphatidylinositol (3,4,5)-bisphosphate</i>
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RAPTOR	do inglês <i>regulatory-associated protein of mTOR</i>
RB-	RPMI com adição de B27 sem insulina
RB+	RPMI com adição de B27 com insulina
RICTOR	do inglês <i>Rapamycin-insensitive companion of mammalian</i>
	<i>target of rapamycin</i>
RIPA	do inglês <i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ácido ribonucleico

RNAseq	Sequenciamento de RNA
RPKM	do inglês <i>Reads per kilo base per million mapped reads</i>
RPM	do inglês <i>Reads per million mapped reads</i>
RTK	Receptor do tipo tirosina-quinase
S473	Serina 473
S6K	Proteína quinase S6
SDC	Seção de Documentação Científica
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
Sucen	Superintendência de Controle de Endemias
T308	Treonina 308
TBS	do inglês <i>tris-buffered saline</i>
TCT	Tripomastigotas derivados de tecido
TOM20	do inglês <i>translocase of the outer membrane 20</i>
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TOM20-GFP	proteína de fusão TOM20-GFP
TS	Trans-sialidase
TWEEN 20	Polioxietileno-20-sorbitan monolaureato
USP	Universidade de São Paulo
VP	Vacúolo Parasitóforo
WNT	do inglês <i>wingless-type MMTV integration site</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Célsius
cm ²	centímetros quadrados
ng	nanograma
nL	nanolitro
nM	nanomolar
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
±	mais ou menos
<	menor
x	vezes
[]	concentração
U	unidades
v	volume
β	beta

RESUMO

Alvim JM. *Efeito da rapamicina na infecção de cardiomiócitos humanos por Trypanosoma cruzi* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A Doença de Chagas é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* e considerada pela Organização Mundial da Saúde uma doença tropical negligenciada endêmica da América Latina. A doença possui uma fase aguda que é dificilmente diagnosticada, porém com altas chances de cura quando tratada, e uma fase crônica que pode ser assintomática ou com manifestações cardíacas e/ou gastrointestinais. Aproximadamente 30% dos pacientes na fase crônica desenvolvem manifestações cardíacas da doença, tendo esses um pior prognóstico quando comparados com indivíduos com outras formas de cardiomiopatia. Não existe tratamento eficaz para essa fase da doença e existe uma grande lacuna no conhecimento da relação parasita-hospedeiro tanto na fase crônica quanto no tecido cardíaco. Assim, o entendimento de mecanismos moleculares de resposta à infecção e que sejam utilizados para a replicação parasitária em células cardíacas se torna essencial. O objetivo desse trabalho foi avaliar a modulação da via de mTOR em cardiomiócitos após a infecção por *T. cruzi*. É descrito na literatura que o parasita pode influenciar a ativação dessa via na célula após a infecção e que esse mecanismo tem relação com efeitos celulares que podem ser benéficos ou não para a infecção. Essas modulações parecem ser dependentes do tipo celular e do estágio do parasita. Neste sentido, o presente trabalho realizou a modulação da via de mTOR em cardiomiócitos derivados de hiPSC utilizando a Rapamicina, um inibidor de mTORC1. Através de expressão proteica verificamos que há ativação de mTORC1 após a infecção (24 hpi) e que a inibição deste complexo utilizando Rapamicina diminui a replicação parasitária (48 hpi). Essa alteração é acompanhada de aumento na taxa de consumo de oxigênio (OCR), principalmente 48 hpi, e o tratamento com Rapamicina foi capaz de reverter a OCR para valores similares ao controle. A quantidade de mitocôndrias foi avaliada para saber se havia correlação com o aumento de OCR, porém essa quantidade é menor que o controle tanto nos grupos infectados quanto no infectado e tratado. Utilizando um indutor de mitofagia (CCCP) foi demonstrado que esse mecanismo ocorre após a infecção, porém a queda na replicação avaliada com a Rapamicina é independente da mitofagia. Avaliando a dinâmica de escape do parasita para o citoplasma foi possível perceber que o efeito da Rapamicina ocorre através do aumento do tempo de retenção dos parasitas no vacúolo parasitóforo, atrasando assim o tempo de multiplicação. Com isso é possível concluir que a inibição de mTORC1 gera efeitos em cardiomiócitos que levam à diminuição de replicação parasitária de maneira independente da biogênese mitocondrial ou mitofagia, mas agindo na dinâmica de escape dos parasitas do vacúolo para o citoplasma.

Descritores: Cardiomiopatia chagásica; Células-tronco pluripotentes induzidas; Cardiomiócitos; Trypanosoma cruzi; Sirolimo; Inibidor de mTOR; Vacúolo parasitóforo.

ABSTRACT

Alvim JM. *Effects of rapamycin on the human cardiomyocytes infection by Trypanosoma cruzi* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Chagas Disease is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* and is considered by the World Health Organization to be a neglected endemic tropical disease in Latin America. The disease has an acute phase that is difficult to diagnose, but with high chances of cure when treated, and a chronic phase that may be asymptomatic or with cardiac and/or gastrointestinal manifestations. About 30% of patients in the chronic phase develop cardiac manifestations of the disease, which leads to a worse prognosis when compared to other heart disease. There is no effective treatment for this phase of the disease and there is a large gap in the knowledge of the parasite-host relationship in both the chronic phase and cardiac tissue. Thus, the understanding of molecular mechanisms of response to infection that are used for parasitic replication in cardiac cells becomes essential. The aim of this study was to evaluate the modulation of the mTOR pathway in cardiomyocytes after *T. cruzi* infection. It is described in the literature that the parasite may influence the activation of this pathway in the cell after infection and that this mechanism is related to cellular effects that may or may not be beneficial for infection. These modulations appear to be dependent on cell type and parasite stage. In this sense, the present work performed the modulation of the mTOR pathway in hiPSC-derived cardiomyocytes using Rapamycin, an mTORC1 inhibitor. Through protein expression, we verified that there is activation of mTORC1 after infection (24 hpi) and that inhibition of this complex using Rapamycin decreases parasitic replication (48 hpi). This change is accompanied by an increase in oxygen consumption rate (OCR), especially 48 hpi, and Rapamycin treatment was able to revert OCR to values similar to the control. The number of mitochondria was assessed to determine whether there was correlation with the increase in OCR, but this amount is lower than the control in both infected and infected and treated groups. Using a mitophagy inducer (CCCP) it has been shown that this mechanism occurs after infection, but the decrease in replication assessed with Rapamycin is independent of mitophagy. Evaluating the parasite escape dynamics for the cytoplasm it was possible to notice that the effect of rapamycin is due to increasing the retention time of the parasites in the parasitophorous vacuole, thus delaying the multiplication time. Thus, it can be concluded that inhibition of mTORC1 generates effects on cardiomyocytes that lead to decreased parasitic replication independently of mitochondrial biogenesis or mitophagy, but acting on the escape dynamics of parasites to the cytoplasm.

Descriptors: Chagas cardiomyopathy; Induced pluripotent stem cells; Cardiomyocytes; Trypanosoma cruzi; Sirolimus; mTORC1 inhibitor; Parasitophorous vacuole.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A Doença de Chagas foi descrita em 1909 por Carlos Chagas, que alcançou um feito único na história da medicina: a descoberta do parasita, seu ciclo evolutivo, o vetor e seus hábitos, o reservatório doméstico e a doença, que leva seu nome (1).

Também conhecida como tripanossomíase americana, a Doença de Chagas está entre as 17 doenças tropicais negligenciadas estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (2) e é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, transmitido de maneira vetorial por insetos da subfamília dos triatomíneos. Esta transmissão pode ser através da picada do inseto ou da ingestão de alimentos contaminados com suas fezes contendo parasitas. Também existe a transmissão não vetorial que ocorre através de transfusão de sangue, doação de órgãos, transmissão vertical e acidentes de laboratório envolvendo o parasita (2,3).

O *T. cruzi* apresenta quatro estágios diferentes em seu ciclo de vida, que é alternado entre o vetor e o hospedeiro (Figura 1). No vetor: 1) o ciclo se inicia com o repasto sanguíneo, quando há ingestão de tripomastigotas presentes no sangue do hospedeiro infectado. Estes tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas no intestino dos triatomíneos. 2) Em decorrência da absorção e declínio da disponibilidade de nutrientes causado tanto pelo vetor quanto pelo parasita que está em fase de proliferação, ocorre adesão dos parasitas à parede intestinal e pausa na divisão celular. Na porção final do trato digestivo do vetor, os parasitas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (4).

Quando esse vetor infectado picar um indivíduo, terá início o ciclo no hospedeiro: 3) os tripomastigotas metacíclicos são liberados juntamente com as fezes e tem acesso à corrente sanguínea pelo local onde ocorreu a picada. Uma vez em contato com o hospedeiro, o tripomastigota é capaz de penetrar diversos tipos celulares, onde irá iniciar o processo de diferenciação em amastigota, forma capaz de realizar divisão binária (5–7). 4) Por fim, a forma amastigota muda a sua conformação gerando novos tripomastigotas flagelados que são capazes de lisar a

célula e infectar o tecido adjacente ou a corrente sanguínea, podendo se disseminar para outras partes do organismo (8).

Figura 1: Ciclo de Transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de Argolo e colaboradores (9).

De uma a duas semanas após a picada do inseto inicia-se a fase aguda da doença, caracterizada por parasitemia acompanhada de resposta imune e manifestações clínicas semelhantes às de uma doença viral, incluindo febre, mal-estar e linfadenopatia. Isso faz com que a procura ao apoio médico e diagnóstico sejam raros, porém quanto mais cedo o tratamento é iniciado, maior a chance de cura. Não havendo cura, os pacientes podem evoluir para a fase crônica ou indeterminada da doença, sendo que na fase indeterminada há um equilíbrio entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro, sem que o primeiro cause grandes danos e o prognóstico seja similar àqueles que não possuem a doença (8,10).

Setenta por cento dos pacientes não tratados que chegam à fase crônica não desenvolvem nenhuma complicação. Os outros 30% podem desenvolver problemas no trato digestivo ou no coração de 10 a 30 anos após a infecção aguda, sendo as complicações cardíacas as mais sérias e frequentes (8,11).

Duas drogas têm sido utilizadas para o tratamento convencional da doença: benzonidazol e nifurtimox. Ambas possuem alta efetividade na fase aguda e baixa na fase crônica (2,11) e estão associadas a efeitos colaterais que podem levar o paciente a abandonar o tratamento antes do seu término, sendo que cada paciente pode relatar efeitos colaterais diferentes (12,13).

Devido à gravidade da doença, medidas para prevenir a transmissão vetorial foram adotadas em países endêmicos bem como maior rigidez e monitoramento em bancos de sangue e transplante de órgãos, o que têm diminuído o número de casos nesses locais (10,14). No Brasil a principal espécie de vetor é o *Triatoma infestans* e segundo relatórios da Superintendência de Controle de Endemias (Sucen) – Departamento de Combate a Vetores, essa espécie está restrita ao noroeste do Rio Grande do Sul e oeste da Bahia (15). Desde 2017 no estado de São Paulo o número de notificações de outras espécies de triatomíneos tem sido preocupante, entre eles *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus*, sendo este o último considerado o segundo principal vetor do *T. cruzi* no Brasil, após o *T. infestans* (15,16).

Com a globalização e aumento da imigração foram relatados casos da doença em países não endêmicos como os Estados Unidos (sétimo com mais indivíduos infectados com *T. cruzi* no hemisfério ocidental), Espanha, Itália (3,14,17,18), Austrália, Japão e Canadá (10). Nesses países, com exceção ao sul dos Estados Unidos, não há presença do vetor e existe pouco conhecimento sobre a doença. Os principais meios de transmissão são através de doação de sangue, transplante de órgãos e transmissão vertical por mães contaminadas (3,17,19,20).

Considerando o impacto da Doença de Chagas tanto em áreas endêmicas quanto áreas não endêmicas, há um crescimento na discussão sobre prevenção, controle, diagnóstico precoce e intervenção terapêutica (21).

1.2. Cardiomiopatia chagásica crônica (CCC)

Aproximadamente oito milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi*, principalmente na América Latina, onde a doença é responsável por mais de 10.000 mortes por ano (22). Um estudo de 2013 estimou que na América Latina o custo em saúde por indivíduo com Doença de Chagas seria de 383 dólares por ano, sendo o

Brasil o país latino com maior prejuízo devido à perda de produtividade e mortalidade dessas pessoas (23).

Mesmo que a mortalidade devido à doença tenha caído nos últimos anos, a Doença de Chagas causa consequências crônicas e irreversíveis no coração, sistema digestório e nervoso (2). De 20 a 30% dos indivíduos infectados irão desenvolver manifestações cardíacas da doença, o que está associado ao aumento da mortalidade (24).

A cardiomiopatia chagásica engloba toda manifestação cardíaca definida pela presença de anormalidades eletrocardiográficas em pacientes com sorologia positiva para a doença. A Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC) é a manifestação clínica mais importante da Doença de Chagas, resultando na maior parcela de morbidade e mortalidade em decorrência da doença. Essa condição se distingue das demais cardiomiopatias devido à distribuição de fibrose nas regiões posteriores e apicais do ventrículo esquerdo e envolvimento do *sinus* nodal e da condução elétrica. No início a CCC pode ser silenciosa, porém pode progredir para uma cardiomiopatia dilatada com falência cardíaca, arritmias ventriculares e distúrbios de condução (25).

As complicações da CCC resultam do remodelamento da matriz colágena seguido de fibrose, levando ao aumento de rigidez miocárdica, disfunção sistólica e diastólica e, por fim, cardiomiopatia dilatada associada à arritmia ventricular e aumento do risco de morte súbita, que é a maior causa de mortalidade entre pacientes chagásicos (3,8,17,20,26). Estudos histológicos mostram a presença de infiltrado inflamatório, juntamente com fibrose e danos às fibras cardíacas (27).

Comparando pacientes que apresentam falência cardíaca decorrente de outras causas com pacientes chagásicos é possível observar que o prognóstico destes é pior (8,26,28–30); além disso, os avanços na área médica que possibilitaram o melhor prognóstico nos casos de falência cardíaca têm um impacto menor nos pacientes chagásicos devido a pouca representação desse grupo em estudos clínicos e menor quantidade de estratégias pensadas diretamente para estes pacientes (26).

O único tratamento disponível para os estágios finais da CCC é o transplante cardíaco, um procedimento caro, complexo e com disponibilidade variável (27), destacando a importância de estudos nessa área.

1.3. Infecção de cardiomiócitos e formação do vacúolo parasitóforo

A instalação do *T. cruzi* no organismo leva à alteração de diversas vias nas células infectadas em resposta ao processo de infecção e replicação parasitária. Essas alterações podem ser tanto um mecanismo de defesa do hospedeiro quanto uma forma do parasita se manter vivo (28). Mesmo que o *T. cruzi* tenha a capacidade de infectar praticamente todas as células nucleadas de mamíferos, possui tropismo por células musculares e do sistema nervoso (31) o que pode estar associado às manifestações patológicas da doença.

Diversas moléculas já foram descritas como importantes no processo de adesão e internalização do parasita, inclusive em cardiomiócitos (29). Dependendo do estágio evolutivo e da cepa de *T. cruzi*, diferentes moléculas são expressas (32). Mucinas, que são o principal componente da superfície do *T. cruzi* são usadas como ligantes que interagem com a célula hospedeira. Trans-sialidases (TS) e glicoproteínas também já foram relacionados com o processo da adesão (33).

As células hospedeiras expressam moléculas que são utilizadas nesse processo. Essas moléculas podem ser ricas em glicose incluindo glicoconjugados e receptores de manose, componentes da matriz extracelular como a fibronectina e proteoglicanos; ou ricas em lipídeos, como os presentes em balsas lipídicas (*membrane rafts*) que são microdomínios de membrana ricos em colesterol onde estão presentes também receptores de LDL (do inglês *Low Density Lipoproteins*), além de diversos receptores de membrana (34) (Figura 2).

Figura 2: Esquema de moléculas envolvidas na interação parasita-hospedeiro expressas no parasita e na célula hospedeira (32).

Atualmente existem cinco mecanismos bem caracterizados de infecção pelo *T. cruzi* em diferentes tipos celulares (34). Ao menos dois desses mecanismos são descritos em células que não efetuam fagocitose, como é o caso dos cardiomiócitos (5). O primeiro tem relação com a sinalização mediada por cálcio através da geração de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3), responsável pelo tráfego de lisossomos para o local de entrada dos parasitas na membrana da célula, onde agem como doadores de membrana para o vacúolo parasitóforo (VP); esse mecanismo é dependente de microtúbulos e da polimerização de actina. O segundo está relacionado com a invaginação da membrana celular através da sinalização de PI3K (do inglês *Phosphoinositide 3-kinases*) que é capaz de fosforilar PIP2 gerando PIP3 na membrana celular e é independente da polimerização de actina; após a invasão celular o parasita inicia uma sinalização bidirecional de cálcio que é essencial para a acidificação do vacúolo parasitóforo (5,6,35).

Independente do processo há recrutamento e fusão dos lisossomos, seja com a membrana celular no momento da infecção ou após a invaginação da membrana celular, uma vez que esse processo de fusão é essencial para a formação de um VP viável e retenção dos parasitas no ambiente intracelular (5,36).

Proteínas associadas à membrana dos lisossomos (LAMP, do inglês *lysosome-associated membrane protein*) são proteínas glicosiladas e ricas em ácido siálico, sendo classificadas como o principal componente do lúmen dos lisossomos. O *T. cruzi* não é capaz de sintetizar ácido siálico, porém possui uma enzima especializada, a trans-sialidase (TS), que é responsável por transferi-lo da membrana do lisossomo para a membrana do parasita, o que favorece o sucesso da infecção ao deixar a membrana do lisossomo mais susceptível à ruptura (6,35–37). Além da ação da TS no processo de infecção, uma complexa rede de peroxidases e superóxido dismutases é responsável pela sobrevivência do parasita após a acidificação do vacúolo, protegendo-o das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (6).

Quando a acidificação ocorre, o parasita escapa para o citoplasma onde se transforma na forma amastigota, capaz de replicar e continuar o ciclo (5–7,36–38). Assim, LAMP1 tem sido descrita como uma proteína importante no processo de invasão e retenção do parasita (36,39).

Figura 3: Modelo de entrada do *T. cruzi* em células não-fagocíticas. Modificado de Burleigh e colaboradores (40).

Considerando os processos biológicos que ocorrem para que haja sucesso na invasão e multiplicação dos parasitas, existem fenômenos que podem prejudicar esse mecanismo. Primeiramente, os lisossomos e a membrana celular são os principais doadores de membrana para a formação do VP, assim, a inibição do tráfego de membranas pode impedir o sucesso da invasão. As fontes doadoras de membrana incluem também endossomos participantes da via de autofagia celular e perturbações nessa via podem influenciar na infecção (5).

A cinética de escape do VP é outro ponto importante para o sucesso da infecção uma vez que perturbações na transformação da forma tripomastigota para a forma amastigota podem acarretar em prejuízo no desenvolvimento intracelular (38).

1.4. Via de PI3K/AKT/mTOR

Como descrito acima, a entrada do *T. cruzi* em células não fagocíticas pode ocorrer de maneira dependente da ativação da via de PI3K. Essa proteína é responsável por diversos efeitos intracelulares a partir da via de sinalização denominada PI3K/AKT/mTOR (41).

Após o reconhecimento de um ligante por seu respectivo receptor, que pode pertencer a diferentes classes, ocorre a ativação desse receptor permitindo sua interação com moléculas regulatórias ou adaptadoras que irão levar à ativação de PI3K. Uma vez ativada, essa proteína é capaz de fosforilar o PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate) presente na membrana, gerando o PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-bisphosphate), que é responsável por ancorar as proteínas AKT e PDK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1) à membrana celular através da ligação com seu domínio de homologia à pleckstrina (PH, de *pleckstrin homology*) (41,42).

Para que haja a ativação de AKT, esta deve ser fosforilada em dois sítios diferentes: serina 473 (S473) e treonina 308 (T308), sendo que a ativação total dessa proteína se dá apenas quando esses dois sítios são fosforilados. As proteínas responsáveis por essas fosforilações são mTORC2 (do inglês *mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 2*) e PDK1, respectivamente (43). A fosforilação de AKT na S473 gera uma modificação na conformação da proteína gerando um sítio de ancoragem que recruta PDK1 e favorece a fosforilação

da T308 (42,44). Quando ativa, AKT é responsável por diversos efeitos celulares, incluindo a inibição de apoptose, angiogênese, metabolismo, crescimento, proliferação, sobrevivência, síntese proteica e transcrição celular (41). Alguns desses efeitos são dependentes da via de mTOR, que é ativada por AKT através da fosforilação de MTORC1, levando à inibição de PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa) e TSC1/2 (Tuberous sclerosis 1/2) e ativação de RHEB (Ras homolog enriched in brain) (45,46).

A via de mTOR (do inglês *mammalian/mechanistic target of rapamycin*) é modulada por diversos mecanismos como ativação de resposta inflamatória e disposição de nutrientes. mTOR é uma proteína quinase pertencente à via das PI3K e composta por dois complexos multiproteicos: mTORC1 e mTORC2 (46).

O primeiro complexo é mais bem caracterizado e composto por mTOR, RAPTOR e mLST8. Quando ativado é responsável pela fosforilação da proteína quinase S6 beta-1 (S6K1) e a proteína-1 de ligação a 4E (4E-BP1) que é um fator de iniciação. A fosforilação de S6K1 e 4E-BP1 leva à ativação e inibição dessas proteínas, respectivamente, levando à síntese proteica, síntese de lipídeos necessários para proliferação celular, metabolismo celular, produção de ATP, aumento do fluxo glicolítico através de HIF-1 α , diminuição da autofagia e mitofagia, e indução de genes de resposta inflamatória (47–50).

O complexo mTORC2, composto por mTOR, RICTOR e mLST8, apesar de menos estudado foi descrito como ativado *downstream* à PI3K e é o responsável pela fosforilação de AKT na serina 473 (S473), que irá atuar através de intermediários para que haja a ativação de mTORC1 (51).

Como forma de controle da via, a ativação de mTORC1 gera uma retroalimentação negativa através de ativação de S6K1 que fosforila RICTOR inibindo mTORC2 e consequentemente diminuindo a ativação de AKT (43,45).

O inibidor clássico de mTORC1 é a Rapamicina, que age nas células após sua ligação com a proteína intracelular FKBP12 (46,52). O complexo Rapamicina-FKBP12 interage com o complexo mTORC1 inibindo sua função. O tratamento com Rapamicina não é capaz de inibir diretamente o complexo mTORC2, porém é demonstrado que seu tratamento prolongado pode alterar a função de mTORC2 dependendo do tipo celular e tempo de tratamento. Essa alteração resulta da associação da Rapamicina com mTOR livre impedindo que haja a formação de

mTORC2. Essa diminuição de função é avaliada através da queda na fosforilação de AKT (T308) (43,52).

Figura 4: Modelo de ativação da via PI3K/AKT/mTOR. Figura original.

A via denominada PI3K/AKT/mTOR é amplamente estudada em diversos cenários, inclusive na relação parasita-hospedeiro, e o tratamento com Rapamicina vem sendo utilizado para modular as respostas em diferentes tipos celulares. Em estudos com *Leishmania sp.*, existem contradições quanto ao impacto de mTOR no desenvolvimento da doença, sendo que um dos estudos propõe que o bloqueio de mTORC1 favorece a replicação do parasita (53) e outros mostram que a ativação de mTOR pode ser benéfica para o parasita, uma vez que essa ativação modula negativamente a autofagia (54,55), bem como é capaz de modular a resposta inflamatória, levando à diminuição de IL-12 e aumento de IL-10, essenciais para a sobrevivência do parasita (56).

Essa via também foi descrita utilizando modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi* em diferentes estudos com diferentes tipos celulares. Em células HeLa (57,58), os autores destacam a relação de mTOR com a infecção mediada por mobilização de lisossomos onde existe uma diferença de resposta dependendo da fase em que o parasita se encontra, sendo que mTOR seria capaz de diminuir a infecção de tripomastigotas derivados de tecido (TCT) e aumentar a de tripomastigotas metacíclico (MT).

Utilizando mioblastos e fibroblastos, Brígido e colaboradores (59) também exploram a dinâmica dos lisossomos, porém focando em proteínas de membrana associadas ao reparo, onde a inibição de mTOR com Rapamicina é capaz de modular a expressão dessas proteínas e diminuir a infecção celular; em um estudo mais recente que utiliza um modelo de infecção com macrófagos, Márquez e colaboradores mostram que o parasita é capaz de ativar a via de mTOR, que se mostra importante para a replicação parasitária nessas células e, ainda, essa resposta é revertida com a adição de Rapamicina que é capaz de conferir um perfil anti-inflamatório a essas células (60).

Finalmente, utilizando cardiomiócitos Libisch e colaboradores (61) mostraram que após a infecção houve ativação da via de AKT/mTORC1, sendo essa via responsável por uma modulação do perfil energético dessas células levando à biogênese mitocondrial em resposta à infecção.

1.5. Uso de cardiomiócitos derivados de hiPSC (hiPSC-CM)

As células tronco de pluripotência induzida (do inglês *induced pluripotent stem cells* - *iPSC*), foram descritas pela primeira vez por Takahashi e Yamanaka em 2006 (62). Essas células são geradas a partir da introdução de quatro genes que codificam fatores de transcrição (Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc) em células somáticas adultas, como fibroblastos (62).

Após o estabelecimento das iPSCs surgiram metodologias de diferenciação dessas células em diferentes tipos celulares, como cardiomiócitos (63,64). A produção de cardiomiócitos derivados de células tronco humanas de pluripotência induzida (hiPSC-CM) surgiu como uma importante fonte para estudos de regeneração cardíaca, *screening* de drogas e modelagem de doenças complexas (63).

A cardiomiopatia chagásica é uma patologia complexa e de difícil modelagem, pois apesar de possuir muitos estudos em animais, estes não podem ser aplicados diretamente à prática clínica devido à diferença entre as espécies estudadas. Com o advento das hiPSC-CM, modelos de infecção em cardiomiócitos humanos tem sido utilizados com sucesso (38,61,65,66) e trazem a oportunidade de ampliar o conhecimento acerca dos processos de infecção e a relação entre o *T. cruzi* e cardiomiócitos humanos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a contribuição da via de mTOR na infecção e replicação do *T. cruzi* em cardiomiócitos derivados de hiPSC.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar atividades *downstream* à via de mTOR após a infecção de hiPSC-CM com *T. cruzi*;
- Avaliar a infecção e replicação parasitária após inibição de mTORC1 com Rapamicina;
- Avaliar a modulação de autofagia e mitofagia nos hiPSC-CM após tratamento com Rapamicina e após infecção com *T. cruzi*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células-tronco humanas de pluripotência induzida diferenciadas em cardiomiócitos (hiPSC-CM)

Os experimentos envolvendo células humanas foram realizados de acordo com as normas e princípios éticos e legais e o projeto foi aprovado e protocolado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP) sob o número SDC 4395/16/061.

Obtenção e reprogramação: As células tronco de pluripotência induzida (hiPSC - do inglês *human induced pluripotent stem cells*) utilizadas foram obtidas no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) e reprogramadas a partir de fibroblastos humanos segundo o protocolo descrito por Somers e colaboradores (2010) (67), com modificações. Essas células foram previamente obtidas e caracterizadas quanto aos marcadores de pluripotência e estabilidade cromossômica e então armazenadas; as células têm origem de doadores saudáveis e foram extraídas a partir do clone SS109.

Também foram utilizadas hiPSC derivadas de fibroblastos com mutação que confere expressão da proteína verde fluorescente (mEGFP) na porção C-terminal da proteína mitocondrial TOM20. Essas células foram adquiridas comercialmente através do Instituto Coriell para Pesquisa Médica (AISC-0011).

Diferenciação em cardiomiócitos: As hiPSC foram submetidas a diferenciação para cardiomiócitos funcionais conforme protocolo adaptado de Lian et al. (2012) (64) usando pequenas moléculas (Figura 5) (68). Esse protocolo é baseado na modulação da via de sinalização de WNT, importante para a proliferação e orientação celular.

As hiPSC foram descongeladas e plaqueadas em placa de seis poços onde foram mantidas até apresentarem a confluência necessária para a condução dos experimentos. Ao apresentarem aproximadamente 75% de confluência, as células foram soltas pela ação de Versene (Life Technologies 15040066), contadas em câmara de Neubauer e, então, plaqueadas de 1 a $1,25 \times 10^5$ células/cm² em placa de

12 poços contendo matriz extracelular Geltrex (Life Technologies A14133-02) em meio E8 (Essencial 8 Basal Media - Life Technologies A15169-01 com adição de Essential 8 Supplement (50x) - Life Technologies A15171-01), esse é considerado o terceiro dia antes do início da diferenciação (D-3). Nos dois dias seguintes (D-2 e D-1) o meio foi trocado por E8 e mTeSR1 (Stemcell Technologies 85852) 1:1 (v/v).

Então no dia zero (D0), quando as células já apresentavam uma confluência de 95-100% o meio foi trocado por RPMI 1640 (Life Technologies 11875-093) suplementado com B27 sem insulina (Life Technologies A18956-01), chamado de RB-, e para o início da diferenciação ele é utilizado com adição de 9 μ M de CHIR99021 (Biobyt 361571), um potente inibidor de GSK3 e ativador de WNT. No D1, metade do meio foi retirado e adicionado 1 mL de meio RB- com adição de 9 μ M de CHIR99021 e 4 μ M de BMP4 (R&D Systems 314-BP/CF), sendo este último regulador da embriogênese que desempenha um papel no crescimento e diferenciação de vários tipos celulares. No dia seguinte (D2), o meio foi trocado por RB- com adição de 2,5 μ M de XAV939 (Cayman Chemical 13596) uma pequena molécula que inibe a via *downstream* de WNT e 2,5 μ M de KY02111 (Cayman Chemical 14315) que promove a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos também através da inibição de WNT; as células foram mantidas nesse meio até o D4, quando o meio foi trocado por RPMI 1640 suplementado com B27 com adição de insulina (Life Technologies 17504-044), chamado de RB+, com adição de XAV939 e KY02111 nas mesmas concentrações já descritas. Entre D5 - D9 as células foram mantidas em RB+ e após o D10 em CDM5 (RPMI 1640, 500 g/mL albumina humana (Sigma-Aldrich A8412), 213 g/mL l-ascorbic acid 2-phosphate (Sigma-Aldrich A8960), 1% de aminoácidos não-essências (Sigma-Aldrich M7145) e 0,1% de antioxidante (Sigma-Aldrich A1345)).

Aproximadamente 10 dias após o início da diferenciação, células contráteis já então denominadas como hiPSC-CM, são facilmente visualizadas por microscopia óptica, porém não são o único tipo celular presente na placa. Assim, no máximo dois dias após o início da contração celular realizamos a seleção metabólica dessas células adicionando 5 mM de lactato (Sigma-Aldrich L4263) ao meio CDM5 (preparado com RPMI 1640 sem adição de glicose (Life Technologies 11879020)) a cada dois dias com duração total de seis dias.

Após essa fase é possível verificar uma considerável perda de células não contráteis e as células que sobreviveram foram soltas pela ação da tripsina (Sigma-

Aldrich 59417C), contadas e plaqueadas sobre matriz de Geltrex na quantidade de $3,5$ a 4×10^4 células por poço em placa de 96 poços para ensaios de fluorescência e 1×10^6 células por poço em placa de 12 poços para demais experimentos. As hiPSC-CM foram cultivadas em meio CDM5 até e durante o desenvolvimento dos experimentos, sendo que o meio foi trocado por CDM5 fresco a cada dois dias e as células foram mantidas em estufa para cultivo celular a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$ até o desenvolvimento dos experimentos de infecção, aproximadamente no trigésimo dia da diferenciação.

Figura 5: Linha do tempo dos tratamentos realizados para diferenciação de hiPSC em hiPSC-CM.

3.2. Infecção celular com *Trypanosoma cruzi*

Cultura de *T. cruzi*: Foi utilizada a cepa Y do parasita *T. cruzi* (tipo II), contendo uma mutação que confere a expressão de GFP nas formas amastigotas, como descrito por Ramirez, *et al.* (2000) (69). Nos experimentos realizados com as células TOM20-GFP, foram utilizados parasitas da cepa Y sem a expressão de GFP.

Para ambas as cepas foram utilizadas a mesma forma de cultivo. Basicamente, células LLC-MK2 (ATCC CCL-7; *American Type Culture Collection*, Rockville, MD) sub-confluentes foram infectadas, em diferentes placas, com aproximadamente 5×10^6 tripomastigotas da cepa de interesse. Parasitas livres no meio foram retirados após 24 horas de infecção e a cultura foi mantida em RPMI 1640 (LGC BR30011-05) com 2% de soro fetal bovino (FBS) a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$. Cinco dias após a infecção, formas livres de tripomastigotas foram encontradas no sobrenadante e retiradas juntamente com o meio, centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos e o *pellet* suspenso em CDM5.

Infecção de cardiomiócitos: Os cardiomiócitos foram mantidos em estufa a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$ e no momento da infecção o meio de cultura foi retirado e trocado por

uma suspensão de *T. cruzi* em CDM5 de modo a obter a proporção de 5:1 (parasitas:célula). Foram utilizados de $17,5$ a 20×10^4 parasitas em $100 \mu\text{L}$ de CDM5 por poço em placas de 96 poços e 5×10^6 parasitas em 2 mL por poço em placas de 12 poços.

As placas retornaram à estufa nas mesmas condições onde permaneceram por 24 e 48 horas. Para análises onde a infecção dura mais que 24 horas, o meio de cultura foi retirado 24 horas pós-infecção (24hpi) juntamente com tripomastigotas livres e foi trocado por meio fresco.

3.3. Modulação da via de mTOR

Para avaliar a participação da via de mTOR no desenvolvimento da infecção e replicação parasitária foi utilizado um inibidor de mTORC1, Rapamicina (LC Laboratories R-500). A Rapamicina foi diluída em DMSO (dimetilsulfóxido) seguindo as orientações do fabricante e diversas alíquotas na concentração de 10 mM foram mantidas a -20°C até o momento da utilização, quando foram diluídas em meio de cultura. Células incubadas com DMSO (veículo – volume correspondente a $10 \mu\text{M}$) foram utilizadas como controle. Foram testadas as concentrações de $0,1$; 1 e $5 \mu\text{M}$, sendo que a última foi a que obteve melhor resposta.

As células foram tratadas com Rapamicina 16 horas antes da infecção. No momento da infecção o meio foi trocado por CDM5 contendo os tripomastigotas de *T. cruzi* e a Rapamicina nas mesmas concentrações do pré-tratamento. Após 24 horas de infecção, as células foram lavadas três vezes com PBS aquecido para retirar os parasitas livres e incubadas com meio fresco contendo a droga. No grupo controle foi realizado o mesmo processo, porém com as células foram incubadas com DMSO.

3.4. Avaliação da infecção e replicação

A avaliação da infecção e replicação foi realizada através de contagem do número de células totais e número total de parasitas por poço, em placas de 96 poços. Para a contagem os núcleos das células e os núcleos e cinetoplastos dos parasitas foram corados com DAPI, os limites celulares foram marcados com faloidina e

dependendo do experimento foi utilizado o parasita que expressa GFP na forma amastigota.

Ensaio de fluorescência: Após 24 e/ou 48 hpi, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas por 30 minutos com paraformaldeído (PFA) a 4% e lavadas novamente com PBS.

A marcação das células foi realizada com uma sonda conjugada à fluorescência que possui alta afinidade por filamentos de actina presentes na membrana das células (Faloidina – Invitrogen A34055) e DAPI (1:100) diluídos em solução de caseína 2% e incubados por duas horas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram lavadas e mantidas em PBS a 4°C e ao abrigo da luz até o momento da aquisição das imagens.

3.5. Modulação e avaliação de mitofagia e autofagia por fluorescência

Para avaliar a participação da via autofágica foram utilizados inibidores de autofagia: 3-metiladenina (3-MA) na concentração de 5 mM (Sigma-Aldrich M9281) e Bafilomicina A1 de *Streptomyces griseus* na concentração de 100 nM (Sigma-Aldrich B1793); as drogas foram utilizadas juntamente com a infecção e mantidas até o final dos experimentos. Também foi utilizado um indutor da mitofagia, Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), na concentração de 10 nM (Sigma-Aldrich C2759) no momento da infecção mantendo o tratamento até o final do experimento.

Nos experimentos onde houve tratamento de Rapamicina com adição dos inibidores (3-MA e Bafilomicina A1) ou CCCP, as células foram pré-tratadas e infectadas somente com Rapamicina; 24 hpi o meio foi retirado, os poços lavados e, então, adicionado meio com a combinação de Rapamicina + 3-MA, Rapamicina + Bafilomicina A1 ou Rapamicina + CCCP. Essa metodologia foi adotada uma vez que o objetivo era avaliar a capacidade dessas drogas de reverter o efeito da Rapamicina sobre a multiplicação parasitária.

Ensaio de imunofluorescência: Após 24 e/ou 48 hpi, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas por 30 minutos com PFA a 4% e lavadas novamente com PBS.

As células foram permeabilizadas com Nonidet P-40 (NP40) 0,1% por 15 minutos e então bloqueadas com caseína 2% por 1 hora. Após esse período, anticorpo anti-LAMP1 H4A3 (IgG de camundongo) (Santa Cruz sc-20011) 1:100 foi incubado por 16 horas a 4°C sob agitação. Os poços foram lavados com PBS e então incubados com solução de caseína 2% com adição de anticorpo secundário Alexa-Fluor 647 Anti-IgG de camundongo feito em cabra (Invitrogen A-21235) na concentração de 1:250 e DAPI (1:100) por duas horas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram lavadas e mantidas em PBS a 4°C e ao abrigo da luz até o momento da aquisição das imagens.

As células que apresentam a expressão de GFP juntamente com a proteína TOM20 foram apenas fixadas e marcadas com DAPI (1:100) diluído em PBS.

3.6. High Content Screening (HCS) e High Content Analysis (HCA)

Após os ensaios de fluorescência, foi utilizado o sistema de microscopia de fluorescência automatizado *IN Cell Analyzer 2200* - GE no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-IV/USP). Para a aquisição das imagens foi considerada a característica de excitação/emissão (nm) da faloidina (555/565), DAPI (358/461), GFP (488/525) e Alexa Fluor 647 (594/633). Foram fotografados ao menos nove campos aleatórios por poço, que não se sobrepõem, em placas de 96 poços (TPP, Sigma-Aldrich Z707910 ou Greiner Bio-One 655986).

Para as análises foram utilizados os *softwares* Image J, IN Carta (GE) e a plataforma de linguagem de programação MATLAB (MATLAB *and Statistics Toolbox Release 2017b*, *The MathWorks*, Inc., Natick, Massachusetts, United States) através de um *script* desenvolvido para o projeto, como detalhado a seguir.

Image J: A quantificação da infecção nos primeiros experimentos foi realizada por clique através do *plug-in* “*Cell Counter*” no *software* ImageJ. Para isso, as imagens obtidas com a marcação para DAPI eram abertas no programa e os núcleos das células (2 a 10 μ m) e dos parasitas (1 a 10 nm) eram contados manualmente. Esses dados foram computados em planilha de Microsoft Excel (2010) onde foi calculada a

quantidade de células totais (soma de todas as células nos nove campos), a quantidade de parasitas totais (soma de todos os parasitas nos nove campos) e a quantidade de parasitas por 100 células.

O Image J também foi utilizado para a contagem de parasitas em VP. Para tanto as imagens de DAPI e LAMP1 marcado com Alexa Fluor 647 foram abertas e foi feita a sobreposição dessas imagens. Então, foi possível avaliar com as duas marcações a presença dos núcleos dos parasitas dentro dos vacúolos marcados por LAMP1. Para isso foram contados manualmente também através do *plug-in* “*Cell Counter*” a quantidade de parasitas e a quantidade de parasitas dentro de vacúolo por célula. Esses dados foram computados em planilha de Microsoft Excel (2010) onde foi calculada a quantidade de parasitas dentro de vacúolo por célula.

Todos os dados calculados em planilhas de Microsoft Excel foram transferidos para o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Softwares Inc. CA, USA) onde os gráficos e as análises estatísticas foram realizados.

As imagens apresentadas nos resultados foram editadas no Image J a fim de permitir a melhor visualização das estruturas destacadas e também foi realizado *merge* de duas ou mais imagens a fim de permitir identificar a localização de diferentes estruturas em uma mesma imagem.

IN Carta: Considerando a grande quantidade de dados gerados a partir da técnica de HCS, a utilização de plataformas automatizadas de análise garante uma avaliação mais rápida, precisa, imparcial e abrangente das imagens.

O software IN Carta foi utilizado para avaliação de infecção, com segmentação para os núcleos celulares, os parasitas e o limite celular.

Também foi utilizado para avaliar a marcação mitocondrial das células que expressam a proteína TOM20 com GFP. Nessa análise foi possível obter dados de quantidade de mitocôndrias por célula.

O software gerou um arquivo de texto separado por vírgulas (CSV, *comma separated values*) com os dados de cada célula, a média dos dados de cada campo e a média dos dados de cada poço. Essas planilhas foram utilizadas para obter os dados de interesse que foram transferidos para o software GraphPad Prism 8.0.

Script na plataforma MATLAB: Para a quantificação de infecção das células com os parasitas que apresentam expressão de GFP na fase amastigota, foi

desenvolvido um *script* de que permite identificar as células pela marcação de núcleos marcados com DAPI (2 a 10 μ m) e o parasita baseado na marcação de GFP (1 a 10 nm) na plataforma de linguagem de programação MATLAB. Do mesmo modo que os softwares anteriores, o número total de células e parasitas por poço resulta da soma desses parâmetros quantificados nas nove imagens por poço. Os resultados da contagem foram então transferidos para uma planilha no Microsoft Excel e calculados os mesmos parâmetros.

A quantificação de infecção, que foi realizada nos diferentes *softwares*, foi validada de acordo com os resultados obtidos manualmente com o Image J e obteve resultados semelhantes nas diferentes plataformas.

3.7. Western blot

Para a análise de expressão proteica por *western blot* as proteínas foram extraídas em tampão RIPA (Tris HCl 157,6 mg, NaCl 175,3 mg, NP-40 1%, Deoxycholato 0,5%, SDS 0,1%, Azida 0,02% em 20 mL de H₂O ultrapura) com inibidores de proteases (Sigma-Aldrich P8340) e fosfatases (C2 - Sigma-Aldrich P5726 e C3 - Sigma-Aldrich P0044). As amostras foram então quantificadas por BCA (Thermo Scientific 23228) e uma quantidade fixa de proteína foi submetida à separação em gel de eletroforese SDS-PAGE 10%, juntamente com um padrão de peso molecular (BioRad Kaleidoscope 161-0324). Após a separação, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (GE HybondP 25006567) em sistema úmido por 16 horas e após este procedimento a membrana permaneceu por 16 horas a 37°C para perfeita secagem e adesão das proteínas. A membrana foi bloqueada por 1 hora com 5% de albumina bovina (BSA, *bovin serum albumin* – Sigma-Aldrich A7030) diluído em tampão PBS com 0,1% de Tween 20 (PBST 0,1%) para evitar ligações inespecíficas. Após esse período, a membrana foi incubada por 16 horas a 4°C sob agitação com anticorpo contra proteínas de interesse diluído em BSA 5%. Depois de sucessivas lavagens com PBST 0,1%, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo secundário conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*), que irá se ligar ao anticorpo primário. Então, a membrana foi lavada

novamente e revelada pelo método de quimiluminescência (ECL). Os anticorpos utilizados bem como as suas diluições estão expostos na Tabela 1.

A obtenção das imagens após a reação de revelação foi realizada no equipamento Image Quant LAS 4000 (GE) utilizando o *software* Image Quant. Essas imagens foram então analisadas no programa ImageJ onde foi gerada a medida da área sob a curva em unidades arbitrárias, medidas que são expressas nos gráficos para indicar a quantidade da proteína presente em cada condição. Todas as amostras foram normalizadas pela quantidade de β -actina.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados em Western blot.

Anticorpos primários				
Anticorpo	Marca	Referência	Espécie	Diluição (v:v)
B-actina	Sigma-Aldrich	A5441	Camundongo	1:10000
4E-BP1 fosforilada	Cell Signaling	2855	Coelho	1:1000
mTOR fosforilada	Cell Signaling	5536	Coelho	1:1000
LC3B	Abcam	ab48394	Camundongo	1:1000
AKT total	Cell Signaling	9272	Coelho	1:1000
AKT fosforilada s473	Cell Signaling	4060	Coelho	1:1000
AKT fosforilada t308	Cell Signaling	9275	Coelho	1:1000
Anticorpos secundários conjugados à HRP				
Espécie	Marca	Referência	Diluição	
Anti-IgG de camundongo feito em cabra	RD	Haf007	1:2000	
Anti-IgG de coelho feito em cabra	Invitrogen	65-6120	1:2000	

3.8. Análise de fluxo extracelular (Seahorse)

Os cardiomiócitos (8×10^4 células/poço) foram plaqueados em matriz de Geltrex em placas XF96. Estas células foram tratadas com Rapamicina e/ou infectadas com *T. cruzi* pelo período de tempo estabelecido nos demais experimentos.

A razão de consumo de oxigênio (*oxygen consumption rate* - OCR) foi mensurada utilizando o kit comercial *Cell Mito Stress* (Agilent 103015-100) no equipamento Seahorse XF96 Analyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as células foram lavadas com o meio XF (*non-buffered* DMEM suplementado com 2 mM de piruvato de sódio, 4 mM de L-glutamina e 10 mM de glicose, pH 7,4) e incubadas à 37°C por 60 minutos na ausência de CO₂. Os níveis basais de OCR foram mensurados por 18 minutos e na sequência foi realizado um teste de estresse mitocondrial com a adição de 2 µM de oligomicina, 2 µM de FCCP, 0,5 µM rotenone/0,5 µM antimicina A. Após o ensaio, a proteína total dos poços foi extraída com RIPA e quantificada por BCA Assay para que esse valor seja utilizado na normalização dos dados obtidos. Os dados adquiridos neste ensaio foram analisados utilizando o software WAVE (Agilent).

3.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média utilizando gráficos de dispersão ou diagramas de caixas. A avaliação de diferença estatisticamente significativa foi obtida através de teste T de *Student* para comparação entre dois grupos, ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni para comparação entre mais de dois grupos. As análises estatísticas foram realizadas usando o *software* GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Softwares Inc. CA, USA) e para todos os experimentos foi considerado significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Cultura de hiPSC-CM e infecção com *Trypanosoma cruzi*

Uma vez caracterizadas, as hiPSC foram submetidas à diferenciação em cardiomiócitos. Os hiPSC-CM apresentaram contração espontânea aproximadamente a partir do décimo dia de diferenciação e mantiveram essa característica após a seleção metabólica e a passagem (Tabela 2).

Tabela 2: Vídeos dos cardiomiócitos apresentando contração espontânea:

hiPSC-CM 10 dias	https://youtu.be/g2lYhl78l70
hiPSC-CM 30 dias	https://youtu.be/NcCS-SCwRoQ

Aproximadamente no trigésimo dia da diferenciação as células foram infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi* (MOI 1:5). A infecção ocorreu nas primeiras 24 horas, onde foi observado parasitas dentro de células já a partir de 1 hora de exposição, com aumento em 3 e 6 horas. Não houve diferença no número de parasitas por célula quando comparado 6 e 24 hpi. Entre 24 e 48 hpi foi observado aumento significativo da quantidade de amastigota intracelular, caracterizando a fase de replicação (Figura 6 A-B).

A)

B)

Figura 6: Avaliação da infecção em hiPSC-CM. A) Contagem de parasitas por célula realizada na plataforma MatLab. Dados expressos em diagrama de caixas considerando os valores mínimo e máximo das amostras, $n=5$. $p=0,0010$ vs. todos os grupos. B) Imagem representativa de hiPSC-CM após 24 e 48h de infecção, com marcação para os núcleos das células e parasitas (cinza), faloidina (vermelho) e parasitas (verde).

4.2. Ativação da via de mTOR após infecção e modulação com Rapamicina

Após a padronização, as células foram infectadas com MOI de 5:1 e os demais ensaios foram realizados. Houve aumento na fosforilação de mTOR 24 hpi (Figura 7A). Quando ativado, mTORC1 atua inibindo a fosforilação de 4E-BP1. Essa atividade é um dos marcadores *downstream* da sua ativação e é possível observar a queda na fosforilação de 4E-BP1 48 hpi na Figura 7B.

A)

B)

Figura 7: Expressão proteica de componentes da via de mTOR. A) Expressão proteica de mTOR fosforilado nos grupos controle e infectado 24 h (branco) e 48 h (preto). Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=3$. $p=0,0027$ vs. Controle 24 h. B) Expressão proteica de 4E-BP1 fosforilado nos grupos controle e 3; 24 e 48 hpi. Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=3$. $p=0,0551$ vs. Controle.

Uma vez constatado que os parasitas são capazes de ativar a via de mTOR logo após a sua entrada nas células com alteração de componentes da via em nível proteico, foi realizada a inibição de mTORC1 utilizando a Rapamicina.

O tratamento foi eficaz na diminuição da fosforilação de mTOR após a entrada do parasita nos dois tempos analisados (Figura 8).

Figura 8: Expressão proteica de mTOR após tratamento com Rapamicina nos grupos com células infectadas e infectadas com adição de Rapamicina 24 h (branco) e 48 h (preto). Os resultados foram normalizados pelo controle não infectado. Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=3$. $p=0,0008$ *T. cruzi* vs. *T. cruzi* + Rapamicina nos dois tempos analisados.

O tratamento com Rapamicina não causou diferença na capacidade de infecção dos parasitas, porém houve uma queda de 35% na replicação (Figura 9A-C). Assim, essa via não está diretamente ligada com a entrada do parasita na célula, mas parece ser modulada durante a infecção e causar efeitos sobre a replicação parasitária.

A)

Figura 9: Avaliação de infecção após modulação de mTORC1. A) Contagem de parasitas por células totais tratadas com Rapamicina na concentração de 5 μ M. Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=3$. $p=0,0139$ entre os grupos DMSO 48 hpi e Rapamicina 48 hpi. B) Imagem representativa da cultura de hiPSC-CM infectada, 48 hpi e C) Imagem representativa da cultura de hiPSC-CM após tratamento com Rapamicina e infecção, 48 hpi. As marcações foram realizadas para os núcleos das células e parasitas (cinza), faloidina (vermelho) e parasitas (verde).

Considerando que a ativação de mTOR é capaz de inibir a autofagia e, consequentemente, a mitofagia, supomos que o uso de Rapamicina poderia induzir a mitofagia e esse fator poderia estar promovendo a queda da replicação parasitária.

Na Figura 10 é possível observar que existe aumento do consumo de oxigênio basal (OCR, do inglês *oxygen consumption rate*) em células infectadas 48 hpi e a adição de Rapamicina é capaz de diminuir o consumo de oxigênio basal em todos os grupos, revertendo o aumento observado 48 hpi.

Figura 10: Dados de consumo de oxigênio. Consumo de oxigênio basal no grupo basal, infectado por 24 e 48 hpi nas condições controle e após tratamento com Rapamicina. Dados expressos em gráfico

de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=3$. $*p=0,0309$ Basal vs. 48 hpi na condição controle e $**p=0,0056$ 48 hpi controle vs. 48 hpi tratado com Rapamicina.

As hiPSC com expressão de GFP juntamente com a proteína mitocondrial TOM20 foram diferenciadas em hiPSC-CM e utilizadas a fim de avaliar diretamente a quantidade de mitocôndrias.

A análise por imagem dessas células (Figura 11) permitiu observar que o tratamento com CCCP (um indutor de mitofagia) ou Rapamicina foi capaz de diminuir a quantidade de mitocôndrias ($p=0,0013$ e $p=0,0065$, respectivamente). As células infectadas (*T. cruzi*) também apresentaram menor quantidade de mitocôndrias ($p=0,0099$) quando comparadas ao grupo controle e não houve diferença entre o grupo infectado e o grupo infectado e tratado com Rapamicina ($p=0,1833$).

Em nosso modelo, mesmo com o aumento de OCR após a infecção, não existe aumento de mitocôndrias e, sim, diminuição de sua quantidade nas células infectadas.

A)

B)

Figura 11: Análise de quantidade mitocondrial utilizando hiPSC-CM com GFP ligado à TOM20. A) Quantificação de mitocôndrias no *software* IN Carta. Dados expressos em diagrama de caixas considerando os valores mínimo e máximo das amostras, $n=3-6$. B) Imagem representativa das células com marcação em TOM20, grupo Controle. As marcações foram realizadas para os núcleos das células e parasitas (cinza) e TOM20 (verde).

Para avaliar se a diminuição na quantidade de mitocôndrias após a infecção pode estar relacionada com a mitofagia e se esse mecanismo pode ter sido o responsável pela queda da replicação parasitária, o CCCP foi utilizado juntamente com a infecção e mantido 48 hpi. Como observado na Figura 12A, a indução de mitofagia com CCCP não foi capaz de modular a infecção nem a replicação parasitária nos cardiomiócitos. Ao utilizar o tratamento com CCCP juntamente com a Rapamicina, é possível perceber que quando os dois tratamentos são realizados em conjunto há queda na replicação parasitária em comparação com o grupo controle ($p=0,0008$) e também com o grupo que recebeu apenas o tratamento com a Rapamicina ($p=0,0311$). Esses dados mostram que apenas a indução de mitofagia com CCCP não é capaz de modular a infecção ou replicação parasitária.

A)

B)

Figura 12: Análise de infecção e replicação após tratamento com CCCP. A) Contagem de parasitas por células totais tratadas com CCCP na concentração de 10 nM. Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=3$. Não existe diferença significativa entre os grupos ($p=0,0785$). B) Contagem de parasitas por 100 células que foram pré-tratadas e infectadas com Rapamicina 5 µM, infectadas com CCCP 10 nM ou pré-tratadas com Rapamicina 5 µM e infectadas com Rapamicina + CCCP 10nM. O pontilhado no gráfico indica a média do grupo controle (apenas infectado). Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=3$. Não houve diferença significativa entre os grupos Controle e CCCP. Há diminuição da quantidade de parasitas no grupo tratado com Rapamicina + CCCP quando comparado com o grupo tratado com apenas Rapamicina ($p=0,0044$) e com CCCP ($p=0,0002$).

4.3. mTOR e vacúolo parasitóforo

Após constatar que a queda de replicação parasitária decorrente da inibição de mTOR é independente da mitofagia, investigamos se esse resultado pode ser devido à modulação da formação do VP e, conseqüentemente, da dinâmica de infecção.

A fim de modular o componente *upstream* da via, foram utilizados 3-MA, que é um inibidor de PI3K da classe III e Bafilomicina A1, amplamente utilizada como inibidora do fluxo autofágico. Ao tratar os cardiomiócitos com Rapamicina e adição de 3-MA ou Bafilomicina, percebemos que o efeito que a Rapamicina produz nas células não é revertido com a adição dessas drogas (Figura 13). Esse é um indicativo que o efeito que a Rapamicina gera na replicação parasitária é independente do seu papel como indutora de autofagia e parece estar relacionado com outros mecanismos.

Figura 13: Análise de replicação após tratamento com 3-MA ou Bafilomicina com adição de Rapamicina. Contagem de parasitas por células totais. A média do grupo controle aparece no gráfico como pontilhado para facilitar a comparação; os demais grupos representam células tratadas com Rapamicina, 3-MA, Rapamicina + 3-MA, Bafilomicina e Rapamicina + Bafilomicina. Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=3$.

Realizando tratamento com essas drogas isoladamente observamos que houve também modulação da infecção e replicação parasitária. Após o tratamento com 3-MA houve queda na infecção celular ($p=0,0064$) mostrando que a modulação da classe III de PI3K desempenha um papel importante na infecção parasitária (Figura 14A). O tratamento com Bafilomicina A1 (Figura 14B), foi capaz de diminuir tanto a infecção quanto a replicação parasitária ($p=0,0019$), confirmando que essa via é utilizada para que haja sucesso na infecção.

A)

B)

Figura 14: Análise de infecção e replicação após tratamento com 3-MA e Bafilomicina A1. A) Contagem de parasitas por células totais tratadas com 3-MA na concentração de 5 mM. Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=3$. $p=0,0064$ entre os grupos DMSO 24 hpi e 3-MA 24 hpi. B) Contagem de parasitas por células totais tratadas com Bafilomicina A1 na concentração de 10 nM. Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=3$. $p=0,0019$ entre os grupos Controle e tratado com bafilomicina.

A medida de distância entre os lisossomos e o núcleo foi avaliada em células após o tratamento com Rapamicina (Figura 15A). Esse tratamento é capaz de diminuir a distância entre os lisossomos e o núcleo, o que significa que eles estão mais distantes do citoplasma, local de entrada dos parasitas.

Com a menor quantidade de lisossomos sendo recrutado ao local da infecção devido ao tratamento com Rapamicina, o próximo passo foi identificar a efetividade da infecção utilizando marcação com LAMP1. Avaliamos se esses parasitas apresentavam uma dinâmica de saída do VP diferente durante a infecção. Foram utilizadas células infectadas e tratadas com Bafilomicina A1 como controle positivo, ou tratadas com Rapamicina, e realizada a contagem de parasitas livres e dentro do vacúolo com marcação para LAMP1 1 hpi e 18 hpi, período anterior à multiplicação parasitária (Figura 15B-E).

A Bafilomicina foi utilizada como controle negativo uma vez que é classicamente utilizada para impedir a fusão dos lisossomos com os VP. A Bafilomicina foi capaz de diminuir a quantidade de parasitas nas células infectadas e a quantidade de parasitas dentro das células foi semelhante entre a Rapamicina e o grupo Controle (Figura 15B).

Mesmo a quantidade de parasitas intracelulares sendo igual entre os grupos controle e tratados com Rapamicina, a porcentagem de parasitas marcados com LAMP1, que indica o sucesso na infecção, é menor 1 hpi quando as células são tratadas com Bafilomicina ou Rapamicina (Figura 15C) comparado ao não tratado.

Após a entrada na célula é esperado que o vacúolo contendo o parasita se fundisse com o lisossomo adquirindo marcação para LAMP1 e, então, o parasita possa escapar do VP para que haja a multiplicação no citoplasma e continuação do ciclo. Porém, quando observamos a razão entre os parasitas 1 e 18 hpi percebemos que a quantidade de parasitas que se mantém no VP é maior no grupo tratado com a Rapamicina (Figura 15D), indicando que a quantidade de parasitas que está escapando para o citoplasma onde ocorre a multiplicação celular é menor. Esse fato pode explicar o motivo pelo qual existe uma menor replicação parasitária quando as células recebem esse tratamento.

A)

B)

C)

D)

E)

Figura 15: Análise de infecção e presença de LAMP1 após tratamento com Bafilomicina e Rapamicina. A) Medida em μm da distancia entre lisossomos marcados com LAMP1 e os núcleos celulares marcados com DAPI. Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=3$. B) Contagem de parasitas por 100 células tratadas com Bafilomicina A1 na concentração de 100 nM ou Rapamicina na concentração de 5 μM . Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=3$. C) Porcentagem de parasitas positivos para LAMP1 nos grupos Controle, tratadas com Bafilomicina A1 na concentração de 100 nM ou Rapamicina na concentração de 5 μM . Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=2-3$. D) Razão entre a porcentagem de parasitas positivos para LAMP1 18 hpi e 1 hpi. Dados expressos em gráfico de dispersão considerando o erro padrão da média das amostras, $n=2-3$. $p=0,0179$ Controle vs. Rapamicina. E) Imagem representativa das células com marcação para LAMP1 (verde) e núcleos das células e parasitas (cinza). Destacado com a seta está um parasita no VP.

5. DISCUSSÃO

Esse trabalho utilizou cultura de cardiomiócitos humanos (hiPSC-CM) a fim de estabelecer um modelo de infecção por *T. cruzi* e avaliar a contribuição da via de mTOR para o desenvolvimento da infecção.

Antes da utilização de hiPSC-CM, dados que avaliassem a relação dos parasitas com os cardiomiócitos eram obtidos apenas de pacientes após transplante ou morte decorrente da CCC ou a partir de modelos animais (65). Essas células foram utilizadas para simular as alterações moleculares que ocorrem em cardiomiócitos humanos após a infecção. Foi possível estabelecer a infecção com sucesso bem como o momento de replicação parasitária (Figura 6). Os resultados apresentados quanto a infecção e replicação parasitária são semelhantes aos apresentados recentemente por Bozzi e colaboradores, que demonstram o perfil que hiPSC-CM apresentam antes e após a infecção por *T. cruzi* (65).

Após estabelecer os momentos de infecção (24 hpi) e replicação (48 hpi) parasitária, dados de expressão proteica mostraram que após a infecção existe ativação da via de mTOR caracterizada pelo aumento da expressão de mTOR e diminuição na fosforilação de 4E-BP1 (Figura 7). Libisch e colaboradores também observaram em modelo de cardiomiócitos humanos que após a infecção há ativação de mTORC1 levando a diferentes fenótipos intracelulares (61). Essa característica também foi observada em macrófagos humanos e murinos (60).

De maneira diferente do que foi mostrado por Libisch (61), em nosso modelo após utilizar o inibidor de mTORC1, a Rapamicina, há diminuição na replicação parasitária (Figura 9). Dados similares foram encontrados utilizando macrófagos, onde a via foi ativada após a infecção e sua inibição causou prejuízo na replicação parasitária bem como mudança no perfil inflamatório dessas células (60). A importância de mTOR na relação parasita/hospedeiro já foi descrita utilizando modelos de infecção por *Leishmania*, onde a inibição da autofagia que é gerada de maneira dependente e também independente de mTOR, se mostra importante na sobrevivência e replicação parasitária (54,55). Nesses trabalhos, esse efeito foi revertido pela ação da Rapamicina que foi capaz de gerar um efeito deletério nos

parasitas e diminuição da replicação. Do mesmo modo, um estudo em macrófagos classicamente ativados mostra que a inibição de autofagia também é capaz de levar ao aumento de conteúdo mitocondrial e aumento de ERO, que pode ser prejudicial para essas células (49).

O resultado de ensaio de fluxo extracelular (Figuras 10) mostra que a razão de consumo de oxigênio dessas células se apresenta aumentada nessa fase. O tratamento com Rapamicina é capaz de reverter esse efeito sobre a respiração celular, retornando aos níveis basais. Esses resultados são semelhantes aos descritos por Libisch e colaboradores (61), que associam a infecção com aumento da taxa de respiração mitocondrial e conteúdo mitocondrial, concluindo que há biogênese mitocondrial após a infecção e que esse é um fator importante para o sucesso da infecção. De maneira contrária, ao avaliar a quantidade de mitocôndrias através da contagem de organelas marcadas com a proteína de fusão TOM20-GFP, é possível perceber que há na realidade uma queda na quantidade de mitocôndrias após a infecção que se mantém inalterada e células infectadas após o tratamento com Rapamicina (Figura 11).

A fim de avaliar se o efeito da Rapamicina sobre a diminuição da replicação estava relacionado com sua capacidade de induzir autofagia e, consequentemente, mitofagia, foi utilizado um indutor específico de mitofagia – o CCCP. Esse tratamento não foi capaz de alterar a infecção ou a replicação parasitária quando usado de maneira isolada (Figura 12). Esses dados sugerem que o efeito do tratamento com Rapamicina sobre a replicação não está associado à mitofagia.

A via de PI3K/AKT/mTOR é bastante estudada no contexto da infecção de cardiomiócitos por *T. cruzi* (70,71). Maeda e colaboradores (57) utilizando células HeLa sugeriram que diferentes formas de parasitas teriam acesso à célula através da modulação de diferentes vias. Eles mostram que tripomastigotas metacíclicos (MT), mas não tripomastigotas derivados de cultura celular (TCT), seriam capazes de ativar a via PI3K/mTOR durante a invasão. Nessa revisão os autores destacam que a via de PI3K é comum em diversos estudos e foi associada à invasão dos parasitas de modo dependente do recrutamento de lisossomos (57).

A diversidade genética entre as diferentes formas evolutivas e espécies de *T. cruzi*, bem como a diversidade entre os hospedeiros leva a diferentes resultados após a infecção (72).

Levando esse fator em consideração, experimentos similares foram realizados a fim de caracterizar esse fator em nosso modelo. Células tratadas e infectadas com Rapamicina foram tratadas com Rapamicina juntamente com inibidores de autofagia 24 hpi e avaliadas 48 hpi (Figura 13). O 3-MA é inibidor de classe III de PI3K e a Bafilomicina A1 é utilizada para impedir a fusão dos lisossomos com fagossomos. Esses tratamentos não foram capazes de reverter o efeito da Rapamicina, pelo contrário, também causam a diminuição na replicação parasitária. Ao realizar o tratamento das células com esses inibidores isoladamente, foi observada uma queda na infecção e replicação parasitária (Figura 14). Esse resultado condiz com o que foi observado por outros estudos que mostram a importância da via de PI3K na infecção de células não-fagocíticas (73,74).

Outro mecanismo que pode influenciar no desenvolvimento da infecção é a sua relação com a localização de lisossomos. Existem semelhanças entre o processo autofágico e a formação do vacúolo parasitóforo necessário para o sucesso na infecção pelo *T. cruzi*, como discutido na introdução. Mostrada pela primeira vez por Romano e colaboradores (73), a relação estabelecida entre o parasita e a célula hospedeira no momento da infecção é dependente de componentes da autofagia e pode ser modulada tanto com a depleção de nutrientes como por agentes farmacológicos como Wortmannin, 3-MA, Bafilomicina A1 e Rapamicina. Romano concluiu que a indução de autofagia por ausência de nutrientes ou tratamento com Rapamicina favorece a fusão de lisossomos com os vacúolos parasitóforos e consequentemente favorece a infecção de TCT. Martins e colaboradores (75) mostraram um mecanismo diferente em MT: o tratamento com Rapamicina modula a localização de lisossomos mantendo-os em região perinuclear e diminui a internalização dos parasitas. Os dois estudos corroboram que os lisossomos e sua localização são importantes para o sucesso da infecção e mostram diferentes respostas ao tratamento com Rapamicina dependendo do estágio dos parasitas.

Nesse trabalho, assim como mostrado por Martins, o tratamento com Rapamicina modula a localização dos lisossomos mantendo-os mais próximo do núcleo (Figura 15A). Ao avaliar a quantidade de parasitas com marcação de LAMP1 ao seu redor, indicativo de parasitas no VP, mostramos uma quantidade menor de parasitas no VP 1 hpi em comparação com o grupo controle e esses parasitas permanecem por mais tempo no vacúolo, atrasando o processo de multiplicação.

De modo geral, concluímos que o tratamento com a Rapamicina está relacionado com a maior permanência dos parasitas no VP por um mecanismo independente da indução de autofagia, o que leva a queda na replicação parasitária.

6. CONCLUSÃO

Foi possível estabelecer um modelo celular de infecção em hiPSC-CM por *Trypanosoma cruzi*. Após a infecção é possível observar a ativação da via de mTOR e, após inibir mTORC1 com Rapamicina, existe diminuição da replicação parasitária. A queda na replicação se mostrou independente da indução de mitofagia, mas tem um efeito na dinâmica do vacúolo parasitóforo. Isso indica que a dinâmica de infecção e escape para o citoplasma onde o parasita irá efetuar a multiplicação é dependente de mTOR e, conseqüentemente, prejudicada quando há adição de Rapamicina.

7. REFERENCIAS

1. Invivo ::: História ::: Carlos Chagas [Internet]. [cited 2019 Aug 8]. Available from: <http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=109&sid=7>
2. WHO WHO. WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. WHO. World Health Organization; 2019 [cited 2019 Jul 20]. Available from: <https://www.who.int/chagas/en/>
3. Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. The epidemiology, clinical manifestations, and management of chagas heart disease. *Clinical Cardiology*. 2015.
4. Barisón MJ, Rapado LN, Merino EF, Pral EMF, Mantilla BS, Marchese L, et al. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Biol Chem*. 2017;
5. Epting CL, Coates BM, Engman DM. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2018 Jun 19];126(3):283–91. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489410002183>
6. Cardoso MS, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front Immunol* [Internet]. 2016 Jan 18 [cited 2019 Feb 13];6:659. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00659/abstract>
7. Paiva CN, Feijó DF, Dutra FF, Carneiro VC, Freitas GB, Alves LS, et al. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest*. 2012;
8. Rassi A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*. 2012.
9. Argolo AM, Felix M, Pacheco R, Costa J. Argolo. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio: Fundação Oswaldo Cruz; 2008. 63 p.
10. Bestetti RB, Otaviano AP, Fantini JP, Cardinali-Neto A, Nakazone MA, Nogueira PR. Mode of death in chronic systolic heart failure: Chagas cardiomyopathy versus systemic arterial hypertension. *International Journal of Cardiology*. 2014.
11. Horizonte B, L Ribeiro BA, Nunes MP, C Rocha MO, Ribeiro AL, Ribeiro AL, et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. 2012;9(10):576–89.
12. Montgomery SP, Starr MC, Cantey PT, Edwards MS, Meymandi SK. Neglected Parasitic Infections in the United States: Chagas Disease. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(5):814–8.
13. Ferraz LR de M, Alves AÉG, Nascimento DDS da S, Amariz IA e, Ferreira AS, Costa SPM, et al. Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on Benznidazole. *Acta Trop* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2018 Jun 15];185:127–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X17312755?via%3Dihub>
14. Sosa-Estani S, Segura EL. Integrated control of chagas disease for its elimination as public health problem - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;
15. Silva RA da. Estado atual da vigilância entomológica da doença de Chagas no estado de São Paulo / Current state of the entomological surveillance of Chagas' disease in the state of São Paulo. *Brazilian J Heal Rev* [Internet]. 2019 Jan 25 [cited 2019 Aug 8];2(2):742–55. Available from: <http://brjd.com.br/index.php/BJHR/article/view/1210/1071>
16. Carlos Fioravanti. Barbeiros chegam à Grande São Paulo : Revista Pesquisa Fapesp [Internet]. 2019 [cited 2019 Aug 8]. Available from: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2019/07/10/barbeiros-chegam-a-grande-sao-paulo/>

17. Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. Chagas Heart Disease: An Update. *The American journal of medicine*. 2015.
18. Repetto EC, Zachariah R, Kumar A, Angheben A, Gobbi F, Anselmi M, et al. Neglect of a Neglected Disease in Italy: The Challenge of Access-to-Care for Chagas Disease in Bergamo Area. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;
19. Pérez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R. Old and new challenges in Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*. 2015.
20. Pinazo MJ, Gascon J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Trop*. 2015;
21. Andrade D V., Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;
22. WHO | Epidemiology. WHO. 2018;
23. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2018 Jun 15];13(4):342–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309913700021?via%3Dihub>
24. Cucunubá ZM, Okuwoga O, Basáñez M-G, Nouvellet P. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis.
25. Carmo M, Nunes P, Beaton A, Chair V, Acquatella H, Bern C, et al. Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management. *Circulation* [Internet]. 2018 [cited 2019 Sep 12];138:169–209. Available from: <http://ahajournals.org>
26. Nadruz W, Gioli-Pereira L, Bernardez-Pereira S, Marcondes-Braga FG, Fernandes-Silva MM, Silvestre OM, et al. Temporal trends in the contribution of Chagas cardiomyopathy to mortality among patients with heart failure. *Heart*. 2018;
27. Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. 2014 [cited 2019 Sep 12]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/683230>
28. H S Rassr R, Rassi A, L WC. Chagas' Heart Disease. *Clin Cardiol*. 2000;23:883–9.
29. Horta Veloso H. Incidence of sudden cardiac death in congestive heart failure: Chagas disease versus systemic arterial hypertension. *Int J Cardiol*. 2014;175:175–6.
30. Shen L, Ramires F, Martinez F, Bodanese LC, Echeverría LE, Gómez EA, et al. Contemporary characteristics and outcomes in chagasic heart failure compared with other nonischemic and ischemic cardiomyopathy. *Circ Hear Fail*. 2017;
31. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: Lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2010.
32. de Souza W, de Carvalho TMU, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* [Internet]. 2010 [cited 2019 Sep 12];2010. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811486>
33. Barrias ES, de Carvalho TMU, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Front Immunol* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2019 Apr 8];4:186. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00186/abstract>
34. Calvet CM, Melo TG, Garzoni LR, R Oliveira Jr FO, Silva Neto DT, S L Meirelles MN, et al. Current understanding of the *Trypanosoma cruzi*–cardiomyocyte interaction. 2012 [cited 2019 Apr 8]; Available from: www.frontiersin.org
35. Maganto-Garcia E, Punzon C, Terhorst C, Fresno M. Rab5 Activation by Toll-Like Receptor 2 is Required for *Trypanosoma cruzi* Internalization and Replication in Macrophages. *Traffic* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2019 May 16];9(8):1299–315. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0854.2008.00760.x>
36. Albertti LAG, 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* [Internet]. 2010 Sep 1 [cited 2019 May 5];12(10):784–9. Available from:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457910001541>
37. Rubin-de-Celis SSC, Uemura H, Yoshida N, Schenkman S. Expression of trypanomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol* [Internet]. 2006 Dec [cited 2019 May 5];8(12):1888–98. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2006.00755.x>
 38. Dias PP, Capila RF, do Couto NF, Estrada D, Gadelha FR, Radi R, et al. Cardiomyocyte oxidants production may signal to *T. cruzi* intracellular development. Tanowitz HB, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017 Aug 23 [cited 2019 Feb 13];11(8):e0005852. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005852>
 39. Andrade LO, Andrews NW. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med* [Internet]. 2004 Nov 1 [cited 2019 Feb 13];200(9):1135–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520245>
 40. Burleigh BA. Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? *Sci STKE* [Internet]. 2005 Jul 19 [cited 2019 May 16];2005(293):pe36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16030288>
 41. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* [Internet]. 2017 Aug 10 [cited 2019 Aug 21];170(4):605–35. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867417308656>
 42. Hresko RC, Mueckler M. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Dec 9 [cited 2019 Aug 14];280(49):40406–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16221682>
 43. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* [Internet]. 2005 Feb 18 [cited 2019 Aug 21];307(5712):1098–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15718470>
 44. Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2002 Sep 1 [cited 2019 Aug 14];22(17):6247–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12167717>
 45. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2007 Jul 10 [cited 2019 Aug 15];12(1):9–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610807001511?via%3Dihub>
 46. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2009 [cited 2019 Aug 15];122:3589–94. Available from: <https://jcs.biologists.org/content/joces/122/20/3589.full.pdf>
 47. Laplante M, Sabatini DM. MTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012.
 48. Zarogoulidis P, Lampaki S, Francis Turner J, Huang H, Kakolyris S, Syrigos K, et al. mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review. *Oncology Letters*. 2014.
 49. Matta SK, Kumar D. AKT mediated glycolytic shift regulates autophagy in classically activated macrophages. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;
 50. Kelly B, O'Neill LAJ. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Research*. 2015.
 51. Manning BD, Toker A. Leading Edge Review AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
 52. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen J-H, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* [Internet]. 2006 Apr 21 [cited 2019 Aug 13];22(2):159–68. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276506002188?via%3Dihub>
 53. Jaramillo M, Gomez MA, Larsson O, Shio MT, Topisirovic I, Contreras I, et al. Leishmania Repression of Host Translation through mTOR Cleavage Is Required for Parasite Survival and Infection. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2011 Apr 21 [cited 2018 Sep 14];9(4):331–41. Available from:

54. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312811000953?via%3Dihub> Biel TG, Rao VA. Mitochondrial dysfunction activates lysosomal-dependent mitophagy selectively in cancer cells [Internet]. 2017 [cited 2018 Nov 27]. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
55. Frank B, Marcu A, De Oliveira Almeida Petersen AL, Weber H, Stigloher C, Mottram JC, et al. Autophagic digestion of *Leishmania major* by host macrophages is associated with differential expression of BNIP3, CTSE, and the miRNAs miR-101c, miR-129, and miR-210. *Parasites and Vectors*. 2015;
56. Cheekatla SS, Aggarwal A, Naik S. MTOR signaling pathway regulates the IL-12/IL-10 axis in *Leishmania donovani* infection. *Med Microbiol Immunol*. 2012;
57. Maeda FY, Cortez C, Yoshida N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Front Immunol*. 2012;
58. 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* [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2019 Mar 21];13(7):943–54. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2011.01590.x>
59. Brígido RT e S, Tavares PCB, Santos MA dos, Santos J de G, Souza MA de, Goulart IMB, et al. *Trypanosoma cruzi* modulates gene expression of plasma membrane repair-related proteins. *Acta Trop* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2019 Mar 21];174:153–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X16303692>
60. Rojas Márquez JD, Ana Y, Baigorri RE, Stempin CC, Cerban FM. Mammalian Target of Rapamycin Inhibition in *Trypanosoma cruzi*-Infected Macrophages Leads to an Intracellular Profile That Is Detrimental for Infection. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Feb 20 [cited 2019 Mar 21];9:313. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00313/full>
61. Libisch MG, Faral-Tello P, Garg NJ, Radi R, Piacenza L, Robello C. Early *Trypanosoma cruzi* infection triggers mTORC1-mediated respiration increase and mitochondrial biogenesis in human primary cardiomyocytes. *Front Microbiol*. 2018;
62. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* [Internet]. 2006 Aug 25 [cited 2019 Jun 26];126(4):663–76. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867406009767>
63. Yoshida Y, Yamanaka S. iPS cells: A source of cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2019 Jun 26];50(2):327–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022282810004050>
64. Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *PNAS*. 2012;
65. Bozzi A, Sayed N, Matsa E, Sass G, Neofytou E, Clemons K V., et al. Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Model to Study *Trypanosoma cruzi* Infection. *Stem Cell Reports*. 2019 Jun 11;12(6):1232–41.
66. da Silva Lara L, Andrade-Lima L, Magalhães Calvet C, Borsoi J, Lopes Alberto Duque T, Henriques-Pons A, et al. *Trypanosoma cruzi* infection of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: an in vitro model for drug screening for Chagas disease. *Microbes Infect* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2019 May 16];20(5):312–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S128645791830073X?via%3Dihub>
67. Somers A, Jean JC, Sommer CA, Omari A, Ford CC, Mills JA, et al. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*. 2010;
68. Santos DB, Krieger JE, Pereira A da C. Uso de células-tronco pluripotentes induzidas para compreensão de alterações em cardiomiócitos de pacientes com cardiomiopatias de base-genética. Universidade de São Paulo; 2015.
69. Ramirez MI, Yamauchi LM, de Freitas LH., Uemura H, Schenkman S. The use of the

- green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2018 Sep 14];111(1):235–40. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685100003091?via%3Dihub>
70. Aoki M del P, Cano RC, Pellegrini AV, Tanos T, Guiñazú NL, Coso OA, et al. Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein. *Microbes Infect*. 2006;
 71. Chuenkova M V, PereiraPerrin M. *Trypanosoma cruzi* targets Akt in host cells as an intracellular antiapoptotic strategy. *Sci Signal* [Internet]. 2009 Nov 17 [cited 2019 Aug 2];2(97):ra74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19920252>
 72. Lewis MD, Francisco AF, Taylor MC, Jayawardhana S, Kelly JM. Host and parasite genetics shape a link between *Trypanosoma cruzi* infection dynamics and chronic cardiomyopathy. *Cell Microbiol* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2019 Apr 30];18(10):1429–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12584>
 73. 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* [Internet]. 2009 Jan 27 [cited 2019 Mar 21];5(1):6–18. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.5.1.7160>
 74. Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl P, Isola ELD. *Trypanosoma cruzi*: Phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp Cell Res*. 2001;
 75. 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;

APÊNDICE

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/08/2016, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **260/16** intitulado: “**ANÁLISE METABOLÔMICA DE CARDIOMIÓCITOS INFECTADOS COM TRYPANOSOMA CRUZI**” apresentado pelo Departamento de COMISSÃO CIENTÍFICA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Alexandre da Costa Pereira

Pesquisador (a) Executante: Juliana Moraes Alvim

CEP-FMUSP, 17 de Agosto de 2016.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa