



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM MECANISMOS DE  
REPARO DE MEMBRANA E BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS  
LIPÍDICOS EM CÉLULAS MUSCULARES: PAPEL NA INFECÇÃO  
POR *Trypanosoma cruzi* IN VITRO**

**Pollianne Garbero Rampinelli**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JUIZ DE FORA

2019

**POLLIANNE GARBERO RAMPINELLI**

**EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM MECANISMOS DE REPARO DE MEMBRANA E BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM CÉLULAS MUSCULARES: PAPEL NA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* IN VITRO**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

**Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Elaine de Almeida**

**Co-Orientadora: Prof. Dra. Heloísa D'Ávila**

Juiz de Fora

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rampinelli, Pollianne Garbero.

Efeito do laser de baixa potência em mecanismos de reparo de membrana e biogênese de corpúsculos lipídicos em células musculares: papel na infecção por *Trypanosoma cruzi* in vitro / Pollianne Garbero Rampinelli. -- 2019.

93 f. : il.

Orientadora: Patrícia Elaine de Almeida

Coorientadora: Heloísa D'Ávila

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Laser de Baixa Potência. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Reparo de membrana. 4. Corpúsculos Lipídicos. 5. Células musculares. I. Almeida, Patrícia Elaine de, orient. II. D'Ávila, Heloísa, coorient. III. Título.

Dedico este Trabalho:

À minha mãe Sônia e a meu pai Jânio, que sempre me apoiaram e  
incentivaram

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o Criador, e a Jesus, o Intercessor, portodo o amor, bondade e misericórdia dos quaistenho recebido, e que têm sustentado a minha jornada;

À minha mãe Sônia e meu pai Jânio, por quem eu vivo e luto e que foram essenciais para a minha vitória através de todo amor, apoio, paciência e de suas orações;

À minhas irmãs Gabriele e Carlyne por todo apoio que ofereceram;

À minha família pelo apoio e por torcerem pela minha vitória;

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Patrícia Elaine de Almeida e á minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Heloísa D`Ávila da Silva Bizarro pela acolhida e pela oportuniade de aprendizado, por todo o incentivo, apoioe por toda paciência.;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia de Paoli pela gentileza, presteza e por toda a contribuição dada ao meu projeto;

À todos os professores da pós-graduação pela dedicação e por toda a experiência coompartilhada que contribuíram para a minha formação;

À banca examinadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia de Paoli e Dr<sup>a</sup>. Patrícia Almeida Machado, pela disponibilidade, coonsiderações e ressalvas, contribuindo assim para o aperfeiçoamento e conclusão desse trabalho;

À Ana Luisa, por todo o auxílio, apoio e por compatilhar de forma tão gentil todo o seu conhecimento;

À todos os amigos e colegas de laboratório, Adriana, Silvoney, Ana Luisa, Bianca, Beatriz, Gabriel, Giuliana, Laíris, Luís, Marco, Remy pelo apoio e colaboração;

Meus agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Imunologia e Doenças Parasitárias e á Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) pelos recursos e pela oportuniade de realizar e finalizar esse projeto de mestrado;

Meus agradecimentos ás agências de fomento Capes e Fapemig que auxiliaram com recursos e financiamentos imprecindíveis;

E por fim, a todos que fizeram parte dessa caminhada.

## RESUMO

A membrana plasmática (MP) é uma estrutura suscetível a danos e que devido a isso apresenta um mecanismo de reparo de membrana (RM) eficiente, essencial para a sobrevivência celular. Um dos mecanismos de reparo consiste na endocitose do dano e selamento da MP mediada por influxo de cálcio. Subvertendo a maquinaria de reparo ao desencadear lesões na MP, protozoários como o *Trypanosoma cruzi* conseguem adentrar mais facilmente as células utilizando vesículas endocíticas formadas durante a ativação destes processos. O *T. cruzi* também é capaz de manipular a biogênese de Corpúsculos Lipídicos (CLs), organelas biologicamente ativas, presentes no citoplasma de células eucarióticas. Adicionalmente, a terapia com laser de baixa potência (LBP) consiste na aplicação de um feixe de luz coerente, colimada e monocromática, de baixos valores de energia como método de potencialização da regeneração e regulação de distúrbios funcionais. Sabendo-se da importância do RM e dos CLs para respostas celulares e durante a infecção, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito do LBP no mecanismo de RM e na biogênese de CLs na ausência ou não de infecção celular por *T. cruzi*. Células musculares indiferenciadas (mioblastos) e diferenciadas (miotubos) de linhagem C2C12, infectadas com a cepa DM28c de *T. cruzi*, foram irradiadas com LBP no comprimento de onda de 808 nm, potência de saída de 100 mW, dose de 30J/cm<sup>2</sup>, por 8 segundos, modo contínuo de emissão de luz, de forma pontual em uma única sessão. Posteriormente as culturas foram infectadas com *T. cruzi* encaminhadas para análises de microscopia, Western Blot e ELISA. Nossos resultados demonstraram que a irradiação com o LBP induziu o aumento da ativação do RM dependente de cálcio em mioblastos e miotubos. Conforme esperado, a infecção por *T. cruzi* aumentou a formação de CLs. Porém, em miotubos irradiados previamente houve uma diminuição dessas organelas. O LBP gerou um aumento da biogênese de CLs em células não-infectadas. A irradiação também foi capaz de modular mediadores inflamatórios ao diminuir os níveis de IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  em células musculares infectadas. Assim, nossos resultados demonstraram a capacidade de modulação do LBP no mecanismo de RM, na biogênese de CLs e de mediadores inflamatórios em modelo de infecção por *T. cruzi*, sugerindo um papel do LBP na permeabilização da MP, no metabolismo lipídico celular e na resposta imunológica.

Palavras chaves: Reparo de membrana, *Trypanosoma cruzi*, Corpúsculos Lipídicos, Laser de Baixa Potência, células musculares.

## ABSTRACT

Plasma membrane (PM) is a structure susceptible to damage and due to this presents an efficient membrane repair mechanism (MR), essential for cell survival. One of the repair mechanisms is endocytosis of damage and sealing of the PM mediated by calcium influx. By subverting the repair machinery by triggering PM injuries, protozoa such as *Trypanosoma cruzi* can more easily enter cells using endocytic vesicles formed during activation of these processes. *T. cruzi* is also capable of manipulating the biogenesis of lipid bodies (LBs), biologically active organelles present in the eukaryotic cell cytoplasm. Additionally, low level laser therapy (LLL) consists of the application of a coherent, collimated and monochromatic beam of light with low energy values as a method of enhancing the regeneration and regulation of functional disorders. Knowing the importance of MR and LBs for cellular responses and during infection, the objective of this study was to investigate the effect of LLL on the mechanism of MR and LBs biogenesis in the absence or not of cellular infection by *T. cruzi*. Undifferentiated (myoblasts) and differentiated (myotubes) muscle cells of the C2C12 strain infected with the *T. cruzi* DM28c strain were irradiated with LLL, at 808 nm wavelength, 100 mW output power, 30 J / cm<sup>2</sup> dose, for 8 seconds, continuous light-emitting mode, spot-time in a single session. Afterwards the cultures were infected with *T. cruzi* and sent for microscopy, Western Blot and ELISA analysis. Our results demonstrated that LLL irradiation induced increased calcium-dependent MR activation in myoblasts and myotubes. As expected, *T. cruzi* infection increased the formation of LBs. However, in previously irradiated myotubes there was a decrease in these organelles. LLL generated an increase in LBs biogenesis in uninfected cells. The irradiation was also able to modulate inflammatory mediators by decreasing IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  levels in infected muscle cells. Thus, our results demonstrated the capacity of LLL modulation in the MR mechanism, in the biogenesis of LBs and inflammatory mediators in a *T. cruzi* infection model, suggesting a role of LLL in PM permeabilization, cellular lipid metabolism and immune response.

Keywords: Membrane repair, *Trypanosoma cruzi*, Lipid Bodies, Low Level Laser, muscle cells.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Desenho esquemático do Mecanismo de ação do LBP.....	22
<b>Figura 2:</b> Modelo de mosaico fluido da MP.....	24
<b>Figura 3:</b> Mecanismo de reparo por “patching” .....	27
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de reparo por brotamento.....	28
<b>Figura 5:</b> Modelo para reparo de MP mediado por endocitose caveolar.....	30
<b>Figura 6:</b> Modelo de invasão de células por <i>T. cruzi</i> mediada por lesão e reparo da MP.....	32
<b>Figura 7:</b> Distribuição do número de casos da doença de Chagas no mundo de 2006 – 2009.....	33
<b>Figura 8:</b> Microscopia eletrônica de varredura das principais formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> .....	37
<b>Figura 9:</b> Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i> em hospedeiro intermediário e hospedeiro definitivo.....	38
<b>Figura 10:</b> Aspectos morfológicos de Corpúsculos lipídicos.....	40
<b>Figura 11:</b> Desenho esquemático dos modelos de biogênese de CLs.....	42
<b>Figura 12:</b> Imagem representativa de mioblastos não diferenciados observados com microscopia de luz.....	53
<b>Figura 13:</b> Imagem representativa da diferenciação miogênica realizada em garrafa de cultura de 75 cm <sup>2</sup> com meio DMEM suplementado com SFC a 2% e 10% observada por microscopia de luz.....	55
<b>Figura 14:</b> Imagem representativa da diferenciação miogênica da diferenciação miogênica realizada em placa de 6 poços com meio DMEM suplementado com SFC a 2% e 10% observada por microscopia de luz.....	56

<b>Figura 15:</b> Miotubos apresentam marcadores de células musculares como Cav-3 .....	57
<b>Figura 16:</b> Imagens representativas demonstrando a expressão de Cav-3 em miotubos observada por microscopia de fluorescência.....	57
<b>Figura 17:</b> Imagens representativas demonstrando células musculares indiferenciadas (A) e diferenciadas (B) apresentam a formação de cavéolas em condições normais.....	58
<b>Figura 18:</b> Mioblastos irradiados com LBP na presença ou ausência de Ca <sup>2+</sup> corados com Iodeto de Propídio.....	59
<b>Figura 19:</b> Miotubos irradiados com LBP na presença ou ausência de Ca <sup>2+</sup> corados com Iodeto de Propídio.....	60
<b>Figura 20:</b> A irradiação prévia com LBP modula a invasão do <i>T.cruzi</i> em mioblastos .....	61
<b>Figura 21:</b> A irradiação prévia com LBP modula a invasão do <i>T. cruzi</i> em miotubos.....	62
<b>Figura 22:</b> Imunofluorescência da Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em mioblastos infectados ou não por <i>T. cruzi</i> MOI 3:1, irradiados (Laser+) ou não (Laser-) com LBP .....	63
<b>Figura 23:</b> Biogênese de Corpúsculos Lipídicos, após 24 horas de infecção contados individualmente.....	64
<b>Figura 24:</b> Imunofluorescência da Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em miotubos infectados ou não por <i>T. cruzi</i> MOI 10:1, irradiados (Laser+) ou não (Laser-) com LBP.....	64
<b>Figura 25:</b> Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em miotubos, após 24 horas de infecção contados por campo.....	65
<b>Figura 26:</b> Síntese de IL-6.....	66
<b>Figura 27:</b> Síntese de IL-10.....	66

**Figura 28:** Síntese de TNF- $\alpha$ .....67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Parâmetros dosimétricos utilizados para irradiação com o LBP.....	48
-----------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

15-LO: 15-lipoxigenase

5-LO: 5-lipoxigenase

A1: Anexina 1

A2: Anexina 2

A5: Anexina 5

A6: Anexina 6

AA: Ácido Araquidônico

ADRP: Proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos  
ALG-2: Apoptosis-linked gene-2 protein

ALIX: ALG-2-interacting protein X

AMP cíclico: Monofosfato de adenosina cíclico

ARF: Fator de ribosilação de ADP

ASM: Esfingomielinase Ácida

ATP: Adenosina trifosfato

BIN1: Myc box-dependent-interacting protein 1

CLs: Corpúsculos Lipídicos

Ca<sup>2+</sup>: Cálcio

Cav-1: Caveolina 1

Cav-2: Caveolina 2

Cav-3: Caveolina 3

CCO: Citocromo c oxidase

CE: Ésteres de Colesterol

Complexo ESCRT: Complexo de Triagem Endossomal Necessários para o Transporte

COX: ciclooxigenase

EE: Ésteres de Esterol

EHD: Eps15 Homology Domain

FGF-2: Fator de crescimento de fibroblasto-2

FIT1: Proteína Transmembranar indutora do armazenamento lipídico 1

FIT2: Proteína Transmembranar indutora do armazenamento lipídico 2

GPI: Proteínas ligadas a glicosilfosfatidil inositol

H<sup>+</sup>: Hidrogênio

IFN- $\gamma$ : Interferon – gama

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-7: Interleucina 7

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-15: Interleucina 15

IL-18: Interleucina 18

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$

IP: Iodeto de Propídio

LLLT: Terapia com laser de baixa intensidade

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MG53: Mitsigumin-53

MOI: Multiplicidade de infecção

MP: MP

MVBs: Corpos multivesiculares

Na<sup>+</sup>: Sódio

NGF: Fator de crescimento nervoso

NO: Óxido Nítrico

PAT: Família composta por perilipina, ADRP e TIP47

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE's: Prostaglandinas

PGE 2: Prostaglandinas 2

PLIN 1: Perilipina 1

PLIN 2: Perilipina 2

PLIN 3: Perilipina 3

PPAR $\gamma$ : Receptor  $\gamma$  ativado por proliferadores de peroxissomos

RE: Retículo Endoplasmático

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SFB: Soro Fetal Bovino

SFC: Soro Fetal de Cavalo

TAGs: Triacilgliceróis

TAUP: Meio de cultura ácido que mimetiza a urina de triatomíneos

Tc-Tox: proteína formadora de poros

TGF $\beta$ : Fator de crescimento tumoral

TIP47: Proteína de interação da porção terminal de 47 quilodaltons

TLR2: Receptor Toll-like 2

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral – alfa

Vps4: Vacuolar sorting protein 4

WHO: Organização Mundial de Saúde



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 –Laser.....	19
1.1.1 –Laser de Baixa Potência e efeitos celulares.....	20
1.2 - A Membrana Plasmática e o Reparo de Membrana.....	23
1.2.1 - Características Gerais.....	23
1.2.2 - Mecanismos Intracelulares de Reparo de membrana.....	26
1.2.3- Processo de reparo de membrana durante a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	31
1.3- <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas .....	33
1.3.1 - Epidemiologia, Imunologia e Tratamento.....	33
1.3.2 - Características Gerais do parasito.....	35
1.4-A infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> e a biogênese de Corpúsculos Lipídicos.....	39
.....	39
1.4.1 - Características Gerais.....	39
1.4.2 - Corpúsculos Lipídicos e infecções.....	42
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
2.1 - Objetivo Geral.....	45
2.2 - Objetivos Específicos .....	45
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>

3.1- Padronização de miotubos.....	46
3.1.1 - Cultura <i>in vitro</i> de C2C12.....	46
3.1.2 – Microscopia de luz.....	46
3.1.3 – Imunofluorescência.....	47
3.1.4 - Western blot.....	47
3.1.5 – Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	48
3.2–Laser de Baixa Potência.....	48
3.3-Análise de reparo de membrana - Coloração com Iodeto de Propídio.....	49
3.4 – <i>Trypanosoma cruzi</i> e infecção <i>in vitro</i> .....	49
3.5 – Grupo Experimental.....	50
3.6- Quantificação da invasão do <i>T.cruzi</i> em células musculares infectadas <i>in vitro</i> .....	50
3.7 - Análise e contagem de Corpúsculos Lipídicos.....	51
3.8 - Dosagem de citocinas.....	51
3.9 - Análise Estatística.....	52
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
4.1 - Padronização de miotubos a partir de células C2C12.....	53
4.2Mioblastos e miotubos com a MP íntegra, apresentam formação de cavéolas de modo basal.....	58
4.3 – Células musculares irradiadas com LBP, na presença ou ausência de Ca <sup>2+</sup> .....	59
4.4 – Quantificação da invasão do <i>T.cruzi</i> em células musculares infectadas <i>in vitro</i> .....	60

4.5 - Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em células musculares infectadas in vitro com <i>T. cruzi</i> , irradiadas ou não com LBP.....	62
4.6 - Produção de citocinas em células musculares infectadas ou não com <i>T. cruzi</i> .....	65
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>

## 1.INTRODUÇÃO

### 1.1) Laser

O laser é um dispositivo que emite luz através de um processo de amplificação óptica baseado na emissão estimulada de fótons (revisto em Perveen A *et al*, 2018). Einstein com a publicação de seu tratado Zur Quantum Theorie der Strahlung, em 1916, propiciou o desenvolvimento teórico do laser, ao descrever o conceito que demonstrou que a energia de um feixe de luz era concentrada em pequenos conjuntos de energia, denominados fótons, explicando assim o fenômeno da emissão fotoelétrica, onde um fóton ao colidir com um elétron, estimula a liberação de outro fóton amplificando a emissão inicial (revisto em Patil UA *et al*, 2008). O primeiro laser foi desenvolvido por Theodore Maiman em 1960 (Maiman TH, 1960).

A luz ou radiação eletromagnética de um laser se caracteriza por ser um fluxo luminoso altamente colimado (feixes de luz paralelos), de alta intensidade de energia e altamente concentrada, que em contato com os diferentes tecidos resulta, de acordo com o tipo do laser, em efeitos fotoquímicos, fototérmicos, fotomecânicos e fotoelétricos (revisto em Azagdoli B *et al*, 2016); ser monocromática (fótons de mesmo comprimento de onda), poder atingir altas intensidades e ser coerente e unidirecional (fótons se propagam na mesma direção sem divergência significativa) (revisto em Husain Z *et al*, 2016).

Os lasers são nomeados de acordo com o meio ativo pelo qual são estimulados. Os aparelhos existentes podem ser classificados segundo o tipo do seu meio ativo (um amplificador óptico), que pode ser sólido, líquido, semicondutor de gás e de fibra (revisto em Perveen A, *et al*, 2018). Os parâmetros utilizados rotineiramente em aplicações clínicas incluem comprimento de onda (nanômetro) que varia entre o vermelho e o infravermelho, frequência, energia (em Joules), fluência ou dose ( $J / cm^2$ ), potência (Watts), irradiância ( $W / cm^2$ ) e tempo (segundos). As principais interações laser-tecido são: fotoquímicas, foto-térmicas, foto-mecânicas, dependendo do tempo de irradiação e da densidade de potência (revisto em Freitas L *et al*, 2016).

Ao atingir o tecido biológico, parte da luz irradiada é absorvida, enquanto a outra parte é refletida, transmitida e espalhada. O efeito de absorção também depende das propriedades do tecido como estrutura, conteúdo de água, condutividade térmica, capacidade de calor, densidade e capacidade de absorver, dispersar ou refletir a energia emitida; e das propriedades do laser como o modo de emissão da luz, potência, densidade de energia e o comprimento de onda (revisto em Azagdoli B *et al*, 2016). A penetração da radiação depende do comprimento da onda, da forma que, quanto menor o comprimento da onda maior será a sua ação (revisto em Hamblin MR *et al*, 2006).

Dessa forma, para que o laser seja efetivo é necessário que seja absorvido pelos tecidos. No caso dos lasers de alta potência (HILT- High-Intensity Laser Treatment), que variam entre 1 a 30Watts, a luz laser é absorvida e age através dos efeitos térmicos produzidos, e seu uso no tecido biológico tem o objetivo de corte tecidual, coagulação e redução microbiana, vaporização e hemostasia (revisto em Sant'Anna EF *et al*, 2017). Já no caso dos lasers de baixa potência (LBP) a variação fica entre 0,001 a 0,1 Watts e a luz laser é absorvida e gera um efeito biomodulador (revisto em Freitas L *et al*, 2016),

### **1.1.1) Laser de Baixa Potência e efeitos celulares**

Tendo surgido pela primeira vez na década de 1967 com o médico e professor húngaro Endre Mester (Mester E *et al*, 1968), a terapia com o LBP, também é chamada de Fototerapia ou Fotobiomodulação. O tratamento consiste na aplicação de uma fonte de luz sobre uma área determinada, utilizando-se baixos valores de densidade de potência ( $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) e doses de energia ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) como método seguro e não invasivo para potencialização do processo de regeneração e regulação de distúrbios funcionais (revisto em Huang YY *et al*, 2009).

Essa terapêutica, utiliza-se de dispositivos conhecidos como Lasers de Baixa Potência (LBP), que emitem uma radiação próximo ao espectro da luz vermelha ou infravermelha, não-térmica, uniforme em comprimento de onda, fase e polarização, o que significa que seus efeitos biológicos não são causados por calor perceptível e sim, por efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotomecânicos nas células dos tecidos irradiados, sendo a luz absorvida, gerando uma alteração química (Lin F *et al*, 2010).

Os métodos mais comuns de administração de radiação de laser de baixa intensidade incluem lasers a base de rubi (694 nm), argônio (Ar) (488 e 514 nm), hélio -neônio (He-Ne) (632.8 nm), criptônio (521, 530, 568 e 647 nm), arseneto de gálio associado a alumínio (GaAlAs) (805 ou 650 nm) e arseneto de gálio (Ga-As) (904 nm) (Lin Feng *et al* 2010) e diodos emissores de luz (LED) (apresentam menor colimação e coerência, em comparação aos LBPs convencionais, resultando geralmente em bandas de emissão mais largas)(Müller *et al*, 2013). Cada um deles com específicos parâmetros de importância: potência de saída do laser (de 0,001 a 0,1 Watts); comprimento de onda (300-10.600 nm); taxa de pulso de 0, ou seja, contínua, para 5000 Hertz (ciclos por segundo); densidade e intensidade de energia ( $10^{-2}$  -10 W / cm<sup>-2</sup>- e dose de 0,01 a 100 J / cm<sup>2</sup>), tipo de exposição e duração do tratamento (Posten W *et al*, 2005).

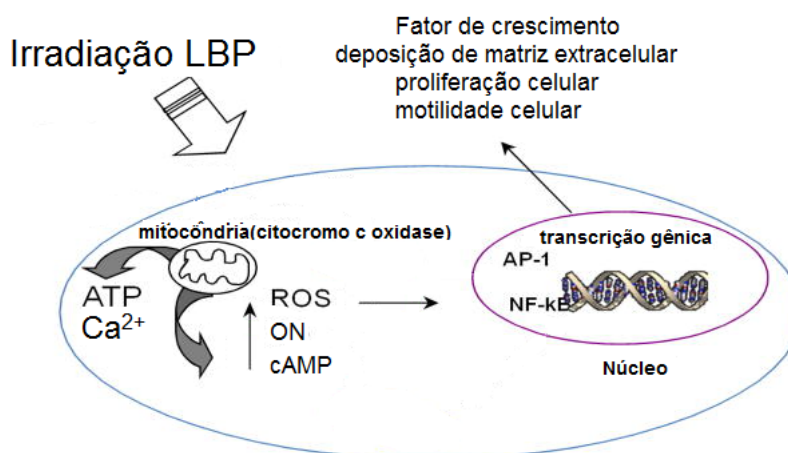
Estudos sugerem que o mecanismo biológico básico de ação do LBP ocorre com a absorção da luz por cromóforos celulares específicos localizados nas mitocôndrias como o complexo enzimático citocromo c oxidase (CCO), cuja atividade é inibida pelo óxido nítrico (NO) (Srinivasan S *et al*, 2012) (Figura 1). Acredita-se que a irradiação com laser pode reverter a inibição da CCO por fotodissociação de NO de seus locais de ligação, ocasionando o aumento do nível de NO, e com isso gerar o aumento do potencial de membrana mitocondrial e conseqüentemente promover um aumento na produção de adenosina trifosfato (ATP), (Hu WP *et al*, 2007; Karu TI, 2008; Zhang L *et al*, 2008).

A alteração na produção de ATP promove um acréscimo na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que participam da ativação da cascata biológica que regula diversos mecanismos celulares (Farivar S *et al*, 2014; Lipovsky U *et al*, 2008). A irradiação com o LBP também gera mudanças na ultraestrutura da mitocôndria induzindo alterações no pH, nos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico) e de Ca<sup>2+</sup> (revisto em Freitas L *et al*, 2016).

Como moléculas quimicamente ativas, ATP, AMP cíclico, NO, Ca<sup>2+</sup> e ROS, desempenham um papel importante na sinalização celular, na regulação da progressão do ciclo celular, na ativação enzimática e na síntese de ácidos nucléicos e proteínas. Elas ativam diversos fatores de transcrição, sendo o mais importante o fator nuclear (NF-κB) e a proteína ativadora-1 (AP-1), fatores de transcrição que regulam a expressão de diversos genes estimuladores e protetores relacionados com

à proliferação e migração celular, à sobrevivência, ao reparo e à regeneração tecidual, a produção de citocinas e fatores de crescimento (Karu TI, 2008; revisto em Chung H *et al*, 2011).

## Mecanismos do LBP



**Figura 1: Desenho esquemático do Mecanismo de ação do LBP.** Ação da luz irradiada pelo LBP sobre a mitocôndria, desencadeando vias de sinalização que alteram a transcrição gênica(Cotler *et al*, 2015).

Trabalhos já publicados demonstraram alterações em mecanismos biológicos após o tratamento com o LBP, como a supressão de citocinas inflamatórias como TNF-alfa e IL-6 (Yamaura M *et al*, 2009); aumento da produção de fatores de crescimento como PDGF, IGF-1, NGF e FGF-2 (Saygun I *et al*, 2008; Safavi SM *et al*, 2008); regulação da via de sinalização intracelular, responsável por controlar a expressão gênica que leva a regulação dos fatores de transcrição relacionados à proliferação celular, sobrevivência, reparo e regeneração tecidual, por exemplo, em tecido epitelial e ósseo (Liu H *et al*, 2005; Hamblin MR, 2006; Snirivasan S *et al*, 2012).

Na Fotobiomodulação diversos benefícios já foram descritos, entre eles: o aumento da atividade da fosfatase alcalina, enzima que participa da mineralização óssea; a melhora da expressão gênica da osteocalcina, marcadores biológicos do metabolismo ósseo e participantes da mineralização do esqueleto; e também

proliferação celular em células ósseas (Renno AC *et al* 2010; Huertas RM *et al* 2014); aumento da sobrevivência de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e de fatores de crescimento em tecido epitelial lesionado (Kim H *et al*, 2008); diminuição da dor e inflamação (El-Maghraby EM *et al*, 2013); síntese de colágeno e regeneração nervosa (Schultz RJ *et al*, 1985; Shen CC *et al*, 2013).

Já foi demonstrado que a terapia com LBP apresenta um efeito bifásico de dose-resposta, no qual existe uma dose de energia ou um intervalo entre doses ideais, tem um efeito bioestimulatório, capaz de promover melhores resultados, e isso varia para cada tipo de patologia, tecido e profundidade. Com um estímulo pequeno pode não ter efeito biológico e um estímulo grande pode ter um efeito bioinibidor ou até mesmo citotóxico (revisto em Huang YY *et al*, 2009).

Apesar dos estudos sobre a Fotobiomodulação terem avançado e considerando o efeito bifásico do LBP, pouco se sabe a respeito das implicações da irradiação com a luz laser nas respostas moleculares e celulares, em especial sobre mecanismos celulares de reparo de membrana plasmática e sobre o metabolismo lipídico celular, relação ainda inédita na literatura.

## **1.2) A Membrana Plasmática e o Reparo de Membrana**

### **1.2.1) Características gerais**

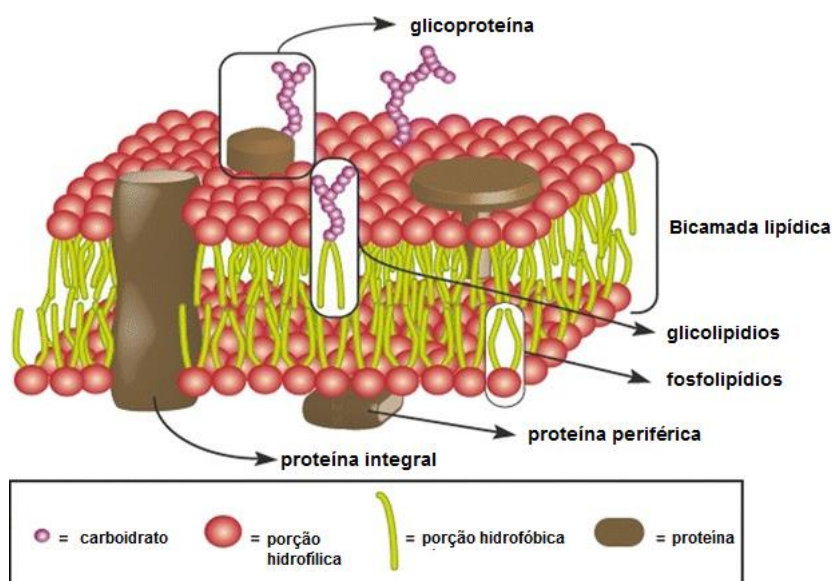
AMP das células eucariontes é um constituinte celular dinâmico e especializado, além de ser responsável por delimitar a célula e controlar a homeostasia celular. É uma estrutura lamelar, fluida, composta por duas camadas de fosfolípidios com características anfipáticas (apresentam uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica), e que são elementos estruturais fundamentais da bicamada lipídica (revisto em Van Meer G *et al*, 2008). Diferentes espécies de fosfolípidos estão distribuídas de forma heterogênea por toda a membrana celular, e devido a esse caráter anfipático, em um meio aquoso eles podem se organizar em ambos os lados, com as porções hidrofóbicas de frente uma para a outra, e as porções polares voltadas para o espaço aquoso externo (revisto em Bernardino de la Serra J *et al*, 2016) (Figura 2).



A fosfatidilcolina e esfingomiéline, compõem predominantemente o folheto externo da MP, enquanto o folheto interno contém fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol (revisto em Van Meer G *et al*, 2008). Também presente como um dos lipídeos de membrana de células animais está o colesterol, localizado entre as caudas hidrofóbicas da bicamada lipídica, e sua presença torna a membrana menos flexível e permeável (revisto em Espenshade PJ *et al*, 2007).

Incorporadas a MP estão proteínas especializadas, segundo maior componente da membrana celular, responsáveis pela realização de funções específicas da membrana, e classificadas em proteínas integrais, incorporadas a matriz da bicamada lipídica, penetram ou atravessam a MP e interagem com a porção hidrofóbica das moléculas lipídicas para estabelecer as interações celulares; e proteínas periféricas, presentes na superfície externa e interna da membrana celular, não aderem ao interior hidrofóbico da membrana (revisto em Goñi FM, 2014).

Na estrutura da MP temos ainda os carboidratos, que participam da formação de diversos marcadores celulares e que quando associados às proteínas formam as glicoproteínas e com os associados aos lipídeos formam os glicolipídios, encontrados exclusivamente no folheto externo da membrana celular (revisto em Bernardino de la Serra J *et al*, 2016).



**Figura 2:** Modelo de mosaico fluido da MP. Visão esquemática da estrutura da MP tal como representada (Lombard J, 2014)

A compartimentalização celular não é a única atribuição da MP, sendo essa estrutura responsável por diversas funções celulares essenciais como: transporte seletivo de moléculas, transdução de estímulos externo em sinais celulares, participação na resposta celular, reconhecimento célula-célula, funções metabólicas e suporte ao citoesqueleto que dá forma à célula (revisado em Kusumi A *et al*, 2012; revisado em Lombard J, 2014;revisado em Bernardino de la Serra J *et al*, 2016).

AMP das células eucariontes não apresenta um envoltório extracelular que a proteja, estando assim, exposta a danos químicos, bioquímicos, elétricos ou mecânicos gerados por estímulos que ultrapassam o limiar fisiológico normal, ou pela presença e atuação de microrganismos invasores capazes de desencadear lesões na membrana. Deste modo, se a MP não for restaurada, pode gerar perda do conteúdo citoplasmático com consequente morte celular, desencadeando distúrbios teciduais (Beller GA *et al*, 1976; McNeil P 1993; Correia *et al*, 2013; Lacovache *et al*, 2008). Assim, para assegurar a homeostasia celular após uma lesão, ocorre o acionamento de um mecanismo rápido e eficiente de reparo (McNeil P *et al*, 2003). Esse processo de reparação permite a resselagem da bicamada lipídica, restaurando a barreira entre os ambientes intracelulares e extracelulares.

No tecido muscular estriado esquelético, lesões geradas devido a toxinas formadoras de poros liberadas por microorganismos patogênicos, ou ainda por isquemia-reperfusão (que gera tumescência celular, acidose, e radicais livres) exemplificam a variedade de lesões que podem acometer a MP. A incapacidade das células em reparar suas membranas leva a geração de patologias ligadas ao desgaste tecidual, como nas distrofias musculares (Cooper S *et al*, 2015).

Para que ocorra o acionamento de um mecanismo rápido e eficiente de reparo, diversos componentes moleculares participam do processo de restauração de membrana, sendo fundamentais para a eficácia do mecanismo. Esses fatores são diferentes em relação a espécie celular, ao tipo e extensão da lesão, sendo invariável, porém, dentre todos os estudos que abordam o reparo de membrana e seus mecanismos, a participação do influxo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), como fator primordial de ativação do processo de reparo, independentemente do tipo de dano e célula afetada (Idone V *et al*, 2008; McNeil *et al*, 2001; Reddy A *et al*, 2001; Babiychuk E B *et al*, 2009; Scheffer L L *et al*, 2014).

Na presença de uma lesão na MP -que deve ser maior que um nanômetro de diâmetro, caso contrário a reparação espontânea ocorre pela difusão de lipídeos ao redor da lesão (Gozen *et al*, 2014)–há o influxo de cálcio do exterior para o interior da célula, através da lesão gerada, levando ao acionamento da maquinaria de reparo (Bi GQ *et al*, 1995).

Esse influxo de cálcio é seguido pela excitação de lisossomos, outro elemento indispensável ao reparo, os quais se fundem a MP e liberam enzimas que auxiliam no remodelando da bicamada lipídica (Reddy A *et al*, 2001). Dentre os fatores secretados pelos lisossomos estão, a esfingomielinase ácida (ASM) e as proteases lisossomais. A ASM atua sobre a esfingomielina dos fosfolípidos da MP, removendo de forma hidrolítica a região da fosforilcolina da esfingomielina, o que resulta na formação de ceramidas, as quais auxiliam na curvatura e brotamento da MP na região lesionada (Tam C *et al*, 2010). Além disso, essas enzimas atuam na proteólise extracelular, ao agir sobre proteínas associadas à superfície celular e na remodelação e degradação da matriz extracelular, facilitando à ASM o acesso ao folheto externo da MP (Castro-Gomes T *et al*, 2016).

### **1.2.2) Mecanismos Intracelulares de Reparo de membrana**

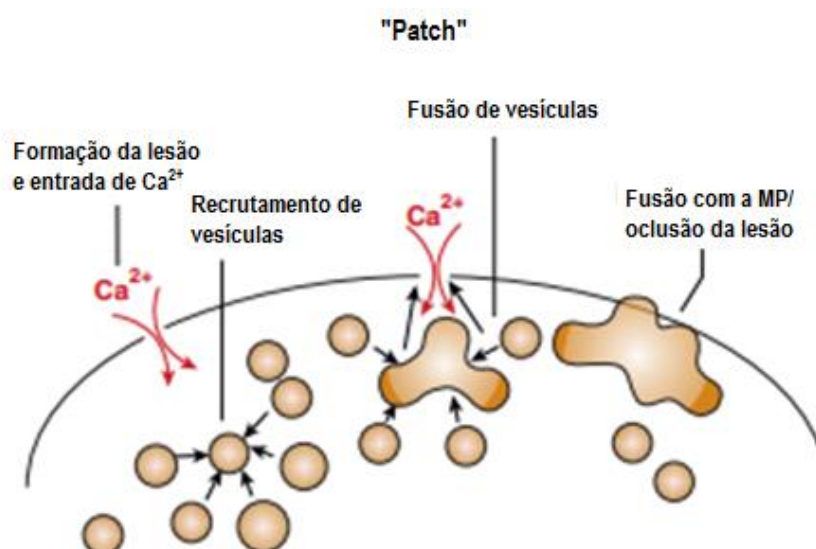
Somados, o influxo de cálcio e a excitação lisossomal, são eventos comuns ao reparo de membrana. Porém, o processo de restauração é heterogêneo e depende do tamanho e da particularidade físico-química da lesão. Já foram descritos diferentes mecanismos de reparo, entre eles, o reparo por “patching”, por brotamento e por endocitose (Miyake K *et al*, 1995; Jimenez *et al*, 2014; Corrote *et al*, 2013).

O mecanismo de reparo por “patching”, foi a primeira hipótese levantada sobre restauração de uma lesão na MP. Esse processo inicia-se com o influxo de cálcio após o dano, o qual estimula a fusão de vesículas citoplasmáticas, as quais se fusionam com a MP, formando um bloqueio dinâmico temporário (McNeil P *et al*, 2000, McNeil P *et al* 2003) (Figura 3).

O influxo de  $Ca^{2+}$  ativa o recrutamento das proteínas anexinas 6, 1, 2 e 5 (A6, A1, A2 e A5), que participam do reparo ao se unirem e formarem juntas um invólucro

externo. Outras proteínas como as Eps15 Homology Domain (EHD), Myc box-dependent-interacting protein 1 (BIN1), denominadas proteínas de reparo, Mitsugumin-53 (MG53) e disferlina em células musculares, também são translocadas e se organizam, compondo uma estrutura de suporte onde o invólucro externo se fixa (Démonbreun *et al*, 2016).

Simultaneamente a formação desse “invólucro”, o citoesqueleto e a bicamada lipídica passam por remodelamento, induzido pela exocitose lisossomal, que diminui a tensão da membrana e a ativação local das GTPases Rho, ocorrendo o recrutamento de filamentos de F-actina e miosina-2 para a borda da lesão, promovendo o fechamento da matriz de forma contrátil (Godin *et al*, 2011). Concluindo o reparo, o revestimento temporário é removido (Idone *et al*, 2008; Bi GQ *et al*, 1995).

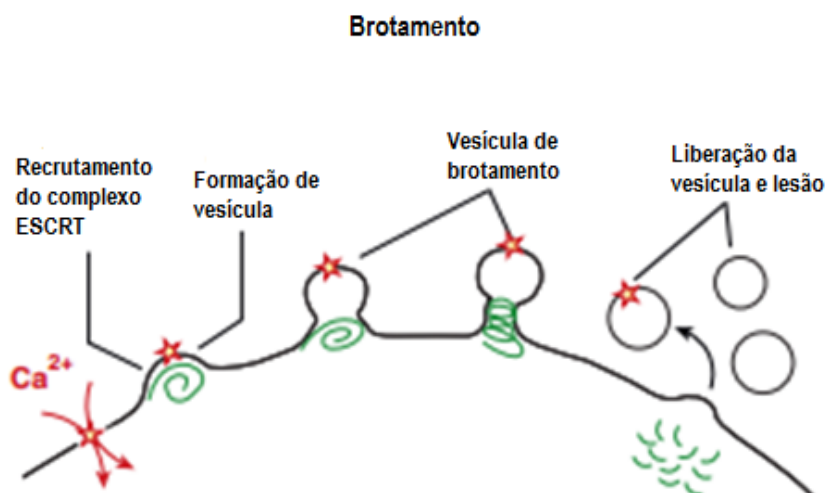


**Figura 3: Mecanismo de reparo por “patching”.** O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da lesão da MP desencadeia a exocitose lisossomal. Inicialmente, foi proposto que isso resultaria na formação de um “patch” de reparo e redução na tensão da membrana facilitando o resselamento espontâneo. Figura adaptada (Andrews NW *et al*, 2018).

O mecanismo de reparo por brotamento, é um mecanismo de reparo de membrana descrito recentemente. Este envolve a participação do Complexo de Triagem Endossomal Necessário para o Transporte (complexo ESCRT) (Jimenez AJ *et al*, 2014), conhecido por ter participação na triagem endossômica, em que receptores ubiquitinilados, são endocitados, agrupados dentro da membrana endossômica, e então divididos em compartimentos de membrana que invaginam,

brotando na luz endossomal para formar corpos multivesiculares (MVBs) (Odorizzi G *et al*, 1998). Composto por cinco subcomplexos, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III e o VPS4 ATPase, o complexo ESCRT também participa da formação de vesículas na replicação viral, e abscisão da ponte intercelular durante a citocinese (McCullough J *et al*, 2013) (Figura 4).

No citoplasma celular, o cálcio liga-se a proteína ligante de cálcio ALG-2-interacting protein X (ALIX), ativando a translocação e acúmulo do complexo ESCRT, em especial o ESCRTIII, responsável por facilitar as alterações na arquitetura da membrana, assim como o acúmulo de proteínas Vacuolar sorting protein 4 (Vps4), no local lesionado. Esse conjunto promove a clivagem da membrana celular lesionada, gerando o desenvolvimento de pequenas vesículas extracelulares que sofrem eliminação através da excreção exocítica, permitindo assim, o reparo da membrana (Scheffer L *et al*, 2014).



**Figura 4: Mecanismo de reparo por brotamento.** O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da lesão na MP promove o recrutamento do complexo ESCRT e a subsequente liberação de “brotos” de membrana. Figura adaptada (Andrews NW *et al*, 2018).

Já o mecanismo de reparo por endocitose, o melhor descrito atualmente, inicia-se com o influxo de cálcio pela lesão. O cálcio internalizado atua no complexo de proteínas SNAREs, complexo formado por três famílias de proteínas, que realiza a integração dos lisossomos com a MP (Sollner T *et al*, 1993; Demaille E *et al*, 2000; Dacks JB *et al*, 2009). Após essa ligação ocorre exocitose e liberação do

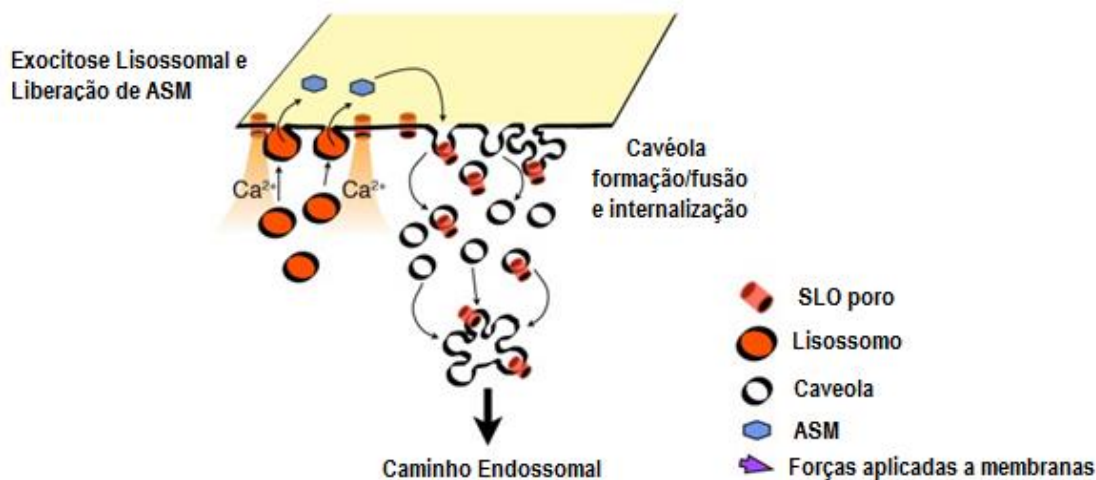
conteúdo lisossomal na superfície lesionada (Rodriguez *et al*, 1997; Söllner *et al*, 1993, Bi GQ *et al*, 1995), originando a formação de uma invaginação local da lesão, gerado inicialmente por ceramidas resultantes da ação da ASM sobre a esfingomiéline da membrana e de enzimas lisossomais (Tam C *et al*, 2010; Corrote *et al.*, 2013; Castro-Gomes T *et al*, 2016).

Na área da invaginação recém-formada, ocorre o recrutamento de proteínas caveolinas, família de proteínas de membrana, Cav-1 e Cav-2, encontradas em diferentes tipos celulares e predominantes em células endoteliais e adipócitos, e Cav-3, presente somente em células musculares (Corrote *et al.*, 2013; Fridolfsson *et al*, 2014). Encontradas principalmente na MP, mas também no Golgi, no retículo endoplasmático, nas vesículas e nas localizações citosólicas, essas proteínas participam de vários processos celulares como o transporte vesicular, a homeostase do colesterol, a transdução de sinal e a supressão tumoral. No processo endocítico do reparo de membrana essas proteínas se agregam na invaginação formada pela ceramida e conferem a continuação da invaginação, gerando uma vesícula que recebe o nome de cavéola (Palade GE, 1953; Rothberg KG *et al*, 1992; Scherer PE *et al*, 1996; Tang Z *et al*, 1996).

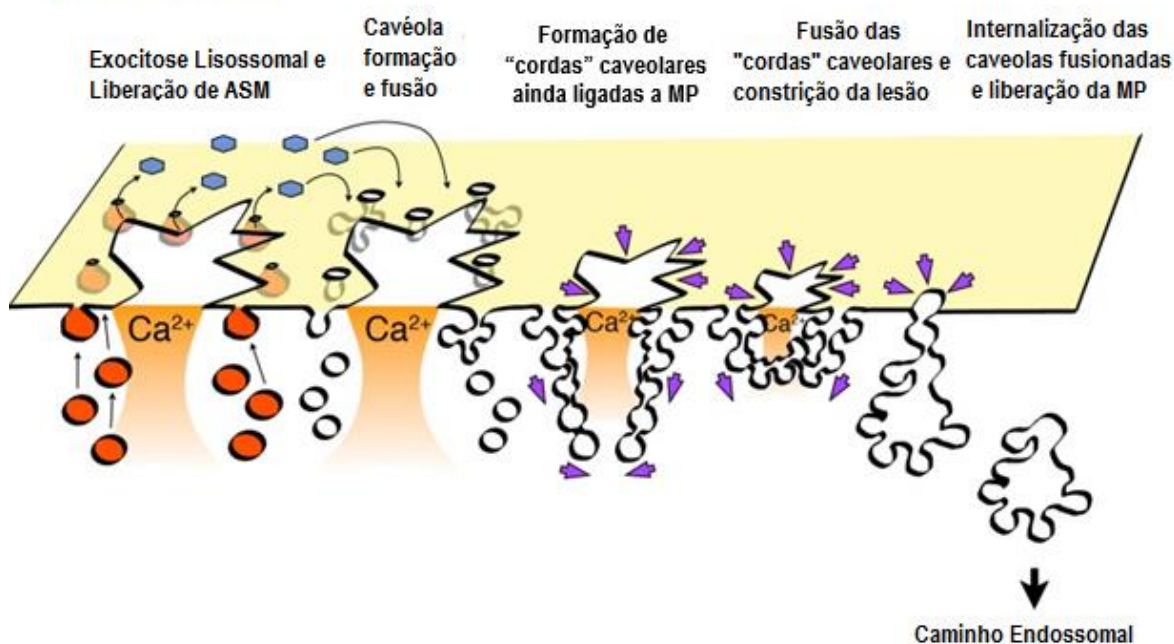
Identificando-se como pequenas invaginações em forma de bulbo localizadas perto ou próximas a superfície da MP, as cavéolas são caracterizadas como microdomínios de membrana, regiões especialmente ricas em glicoesfingolipídeos, colesterol, proteínas ligadas a glicosilfosfatidil inositol (GPI- ancoradas) e caveolinas (para revisão ver Lo HP *et al*, 2016). Participam de vários papéis na fisiologia celular, servindo de plataforma para diferentes caminhos de sinalização tais como: pinocitose, transcitose e endocitose independente de clatrina.

A cavéola formada pode ser única e estruturada sobre a lesão quando esta é diminuta, ou múltiplas e estruturadas ao redor da lesão, quando esta é extensa. Neste último caso, as cavéolas fundem-se em determinado momento, formando uma vesícula endocítica única. A força gerada pela internalização das cavéolas realiza a constrição das bordas da membrana lesionada, propiciando o resselamento da MP, ao passo que a vesícula internalizada desvincula-se da MP levando consigo a região danificada para a via endocítica (Corrote *et al*, 2013; Corrote *et al*, 2014)(Figura 5).

## A Poros Transmembranares



## B Lesão Mecânica



**Figura 5: Modelo de reparo de MP mediado por endocitose caveolar.** Em (A) a permeabilização com toxina formadora de poro ou em (B) uma lesão mecânica, desencadeiam o influxo de Ca<sup>2+</sup>, a exocitose lisossomal e liberação de ASM, geram ceramidas no folheto externo da MP, processo que promove a internalização e fusão das cavéolas. A toxina é removida por endocitose caveolar (A), enquanto uma maior extensão da lesão na bicamada lipídica seria gradualmente constricta e resselada pelo resultado das forças geradas do agrupamento intracelular, fusão e internalização de cavéolas fusionadas (B). Figura adaptada (Corrote *et al*, 2013).

Outros fatores participantes da maquinaria de reparo descritos atualmente são: A calpaina 3, responsável por clivar proteínas do citoesqueleto e o remodelar durante o reparo de membrana (Xie XY *et al*, 1991). Nas células musculares, a disferlina, proteína transmembranar localizada principalmente na MP e nos túbulos T das fibras musculares, é responsável por mediar a exocitose e fusão lisossomal ao longo do processo de reparo (Defour A *et al* 2014), e sua alteração culmina com o desenvolvimento de distrofias musculares, como a Distrofia Muscular de Duchenne (Vontzalidis U *et al*, 2014).

### **1.2.3) Processo de reparo de membrana durante a infecção por *T. cruzi***

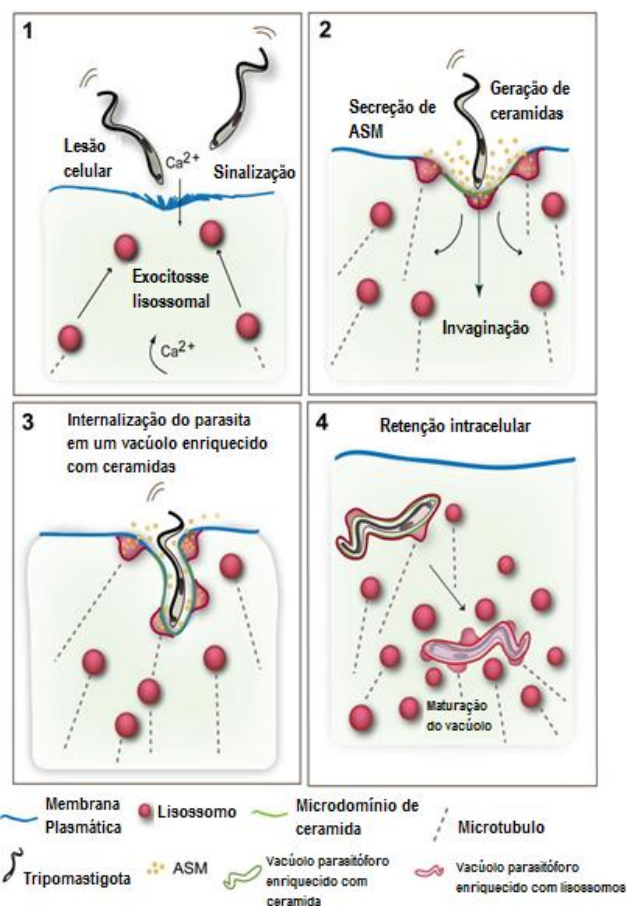
Alguns microrganismos patogênicos, utilizam a maquinaria de reparo endocítico durante a infecção em seu benefício, como uma forma favorável pela qual conseguem realizar invasão celular. Este é o caso do *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado intracelular obrigatório, causador da Doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana (revisito em Álvarez-Hernández DA *et al*, 2018).

A forma infectante do parasito, o tripomastigota, interage com a célula-alvo através da expressão de moléculas de superfície (Burleigh B *et al*, 1995; Burleigh B *et al*, 1998; Caler EV *et al*, 1998; Yoshida N, 2006) ou de vesículas extracelulares (Bayer-Santos E *et al*, 2013; Bayer-Santos E *et al*, 2014), que desencadeiam a ativação de diferentes vias de sinalização. Além disso, a atividade de uma proteína formadora de poros produzida pelo protozoário (proteína Tc-Tox), ou a deformação mecânica da bicamada lipídica devido a motilidade flagelar, pode induzir danos a MP (Andrews NW *et al*, 1989; Fernandes MC *et al*, 2011).

A interação do protozoário com a MP, desencadeia a sinalização de  $Ca^{2+}$  no interior da célula a ser infectada, ocasionando o recrutamento e fusão de lisossomos no sítio de invasão do parasito (Tardeux I *et al*, 1992), e/ou a ativação da via endocítica de reparo (Tardeux I *et al*, 1994). Em ambos os casos há a migração e liberação do conteúdo lisossomal, com a formação de uma vesícula endocítica enriquecida com ceramida. Durante o processo de internalização, a vesícula endocítica transporta consigo o protozoário, caracterizando o vacúolo parasitóforo,



que posteriormente se funde a lisossomos, originando o fagolisossomo(Fernandes MC *et al*, 2011; Fernandes MC *et al*, 2012) (Figura 6).



**Figura 6: Modelo de invasão de células por *T. cruzi* mediada por lesão e reparo da MP.** Em (1) tripomastigotas geram uma lesão na membrana celular, causando influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular e exocitose lisossomal. Eventos de sinalização também geram transientes citosólicos de  $Ca^{2+}$ . Em (2) a liberação extracelular de ASM lisossomal gera ceramida no folheto externo da MP. Em (3) os microdomínios da MP facilitam a internalização do tripomastigota, e lisossomos se fundem com o vacúolo parasitóforo nascente, liberando ASM e gerando mais ceramida. Em (4) os tripomastigotas internalizados que residem em vacúolos parasitóforos fundem-se com lisossomos adicionais, levando à retenção do parasito no interior celular. Figura adaptada (Fernandes MC *et al*, 2012).

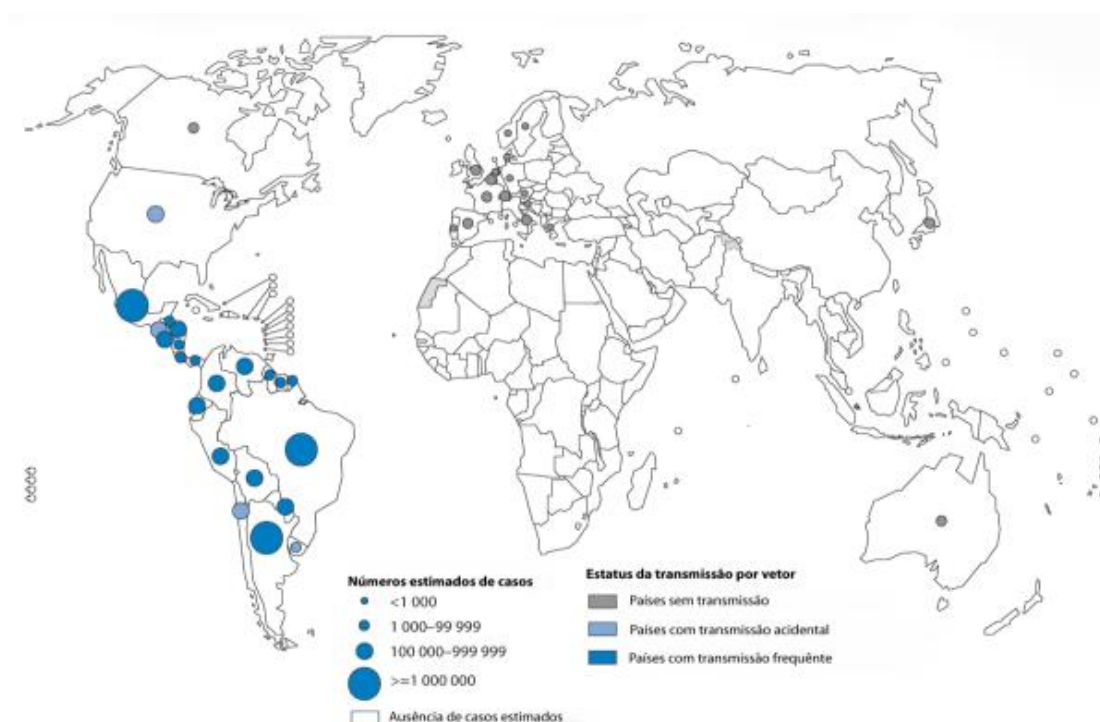
O *T. cruzi* é capaz de infectar e se replicar em macrófagos, células dendríticas, neurônios, células cardíacas e células musculares (Overtvelt LV *et al*, 1999). Acredita-se que a eficácia de invasão, um dos fatores fundamentais que garantem o sucesso da infecção e persistência do parasito, está relacionada a capacidade do protozoário de subverter a maquinaria de reparo a seu favor, sendo também a razão pela qual o *T. cruzi* apresenta tropismo com o tecido cardíaco e o tecido muscular (Andrade *et al*, 1999; Cabrine-Santos M *et al*, 2001). Este último apresenta uma

intensa atividade de reparo, devido aos diferentes estímulos aos quais está exposto, como sobrecarga, lesões diretas e contração constante, que geram micro lesões nas membranas plasmáticas das células musculares, podendo ser este um dos fatores que estabelece a afinidade do *T. cruzi* pelo tecido muscular (Fernandes MC et al, 2012).

### 1.3) *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

#### 1.3.1) Epidemiologia, Imunologia e Tratamento

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), afetando cerca de 7-8 milhões de pessoas e causando dez mil mortes por ano em todo o mundo, a patologia causada pela infecção por *Trypanosoma cruzi*, conhecida como Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, é uma enfermidade crônica que apresenta um importante impacto na saúde pública mundial, principalmente na América latina, onde é endêmica (WHO, 2018) (Figura 7).



**Figura 7: Distribuição do número de casos da doença de Chagas no mundo de 2006 - 2009.** Região das Américas do Sul e Central apresentam a maioria da incidência da doença de Chagas no mundo. Figura adaptada (WHO, 2010).

A Doença de Chagas pode ser transmitida de forma horizontal, (através da picada de vetores biológicos – triatomíneos-, transfusão de sangue, órgãos, via oral, e de forma vertical (via congênita) (revisto em Álvarez-Hernández DA *et al*, 2018). Foi descrito que o controle dos vetores (principal forma de transmissão do protozoário) tem sido eficaz, porém, a transmissão por via oral através do consumo de alimentos contaminados com o Triatomíneo ou suas fezes, como no açaí, tornou-se uma forma importante e preocupante de manutenção do ciclo epidemiológico do *T. cruzi* (Dias JCP *et al*, 2006).

Exibindo duas fases clínicas distintas (fase aguda e fase crônica), o período onde pode-se observar intensa replicação do protozoário, tripomastigotas na corrente sanguínea e ninhos de amastigotas em diferentes órgãos, compreende a fase aguda da Doença de Chagas, caracterizada por uma intensa atividade imune local e sistêmica. Inicialmente desencadeia-se a resposta imune inata, onde há o recrutamento de macrófagos, células dendríticas e células NK, que apresentam papel indispensável na proteção contra o *T. cruzi*; com produção de Óxido Nítrico (ON) e secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL 1 $\beta$  (Boscardin SB *et al*, 2010, revisto em Acevedo GR *et al*, 2018).

Potencializando a resposta imune inata, ocorre ativação dos componentes do sistema imune adaptativo como os Linfócitos B, T CD4+ e T CD8+, que auxiliam no controle da parasitemia através de inúmeros mecanismos, incluindo a atividade citolítica, a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ), pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) e neutralização por anticorpos (revisto em Cardillo FP *et al*, 2015). As principais alterações clínicas que podem ser observadas são mal-estar, cefaléia, astenia, hiporexia, edema, hipertrofia de linfonodos hipertemia, sinal de Romaña (edema bipalpebral), chagoma, entre outros sinais inespecíficos (revisto em Nóbrega AA *et al*, 2009).

A atividade do sistema imune é capaz de controlar a infecção e eliminar o protozoário da corrente sanguínea, porém o *T. cruzi* por apresentar inúmeros mecanismos de evasão, permanece no organismo, em equilíbrio com o hospedeiro, o que caracteriza a fase crônica da infecção. Nesse estágio ocorre a diminuição crônica significativa da atividade dos componentes do sistema imune, com

predominância de células T CD8 +, citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , IL-10), e de anticorpos (Albareda MC *et al*, 2006; Gomes JAS *et al*, 2003). A fase crônica persiste por toda a vida do paciente, que pode se tornar um portador sintomático (manifestando sintomas como palpitação, dispnéia, edema, dor precordial, tosse, tonturas, desmaios, acidentes embólicos extrassistólicas) ou portador assintomático, sendo o último o mais comum. Uma pequena parcela de infectados evolui para a forma cardíaca (cardiomiopatia chagásica) ou digestiva (megacólon e/ou megaesôfago) da doença, geradas por uma reativação imune e reação inflamatória desbalanceada no sítio da infecção, provocando lesões teciduais associadas a morbidade e mortalidade dos pacientes chagásicos (Boscardin SB *et al*, 2010).

Nenhum tratamento proposto tem sido capaz de eliminar o parasito do paciente. Atualmente, apenas duas drogas têm sido utilizadas no combate a infecção por *T. cruzi*: Benznidazol e Nifurtimox. Ambos os medicamentos são de atividade tripanocida, porém apresentam baixo sucesso terapêutico durante a fase crônica da Doença de Chagas, ao contrário da eficácia exibida durante a fase aguda dessa patologia. Outro fator negativo associado ao uso desses fármacos são os inúmeros efeitos adversos manifestados pelos pacientes (revisto em Álvarez-Hernández DA *et al*, 2018). Com isso têm-se buscado medidas terapêuticas alternativas, que apresentem eficácia contra a infecção e efeitos colaterais reduzidos no paciente.

### **1.3.2) Características Gerais do parasito**

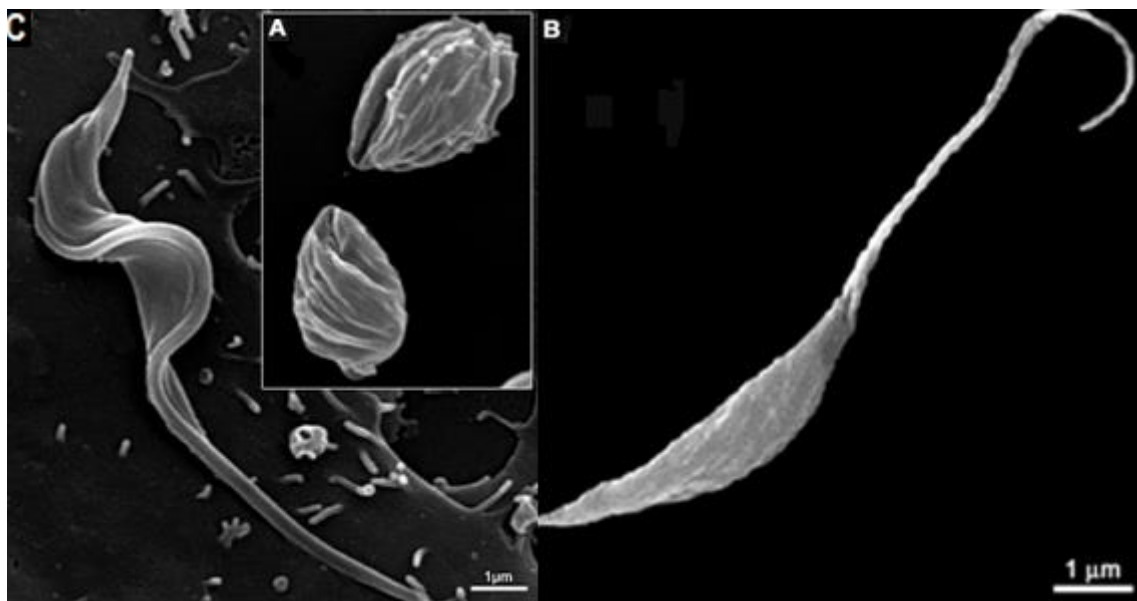
Pertencente à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma*, e subgênero *Schizotrypanum*, o *Trypanosoma cruzi* exibe três principais formas evolutivas: tripomastigota, epimastigota e amastigota, sendo capaz de parasitar em diferentes populações de hospedeiros vertebrados, como em mamíferos, e invertebrados, por exemplo, em insetos vetores (revisto em Álvarez-Hernández DA *et al*, 2018).

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* envolve dois hospedeiros (definitivo e intermediário), e variação em sua forma e estrutura celular, que se diferenciam pela perda de algumas estruturas celulares como, por exemplo, do flagelo em

amastigotas e aquisição de outras estruturas, como por exemplo, membrana ondulante em tripomastigotas (Tyler KM *et al*, 2001). A forma amastigota caracteriza-se pelo seu formato circular ou ovoide, com pouco citoplasma e núcleo grande, onde o flagelo é retido na bolsa flagelar. Constitui a forma replicativa do protozoário, apresentando-se no interior das células dos hospedeiros infectados, principalmente macrófagos e células musculares cardíacas (Burleigh BA *et al*, 1995). É considerada a forma evolutiva de hospedeiros vertebrados (Figura 8A).

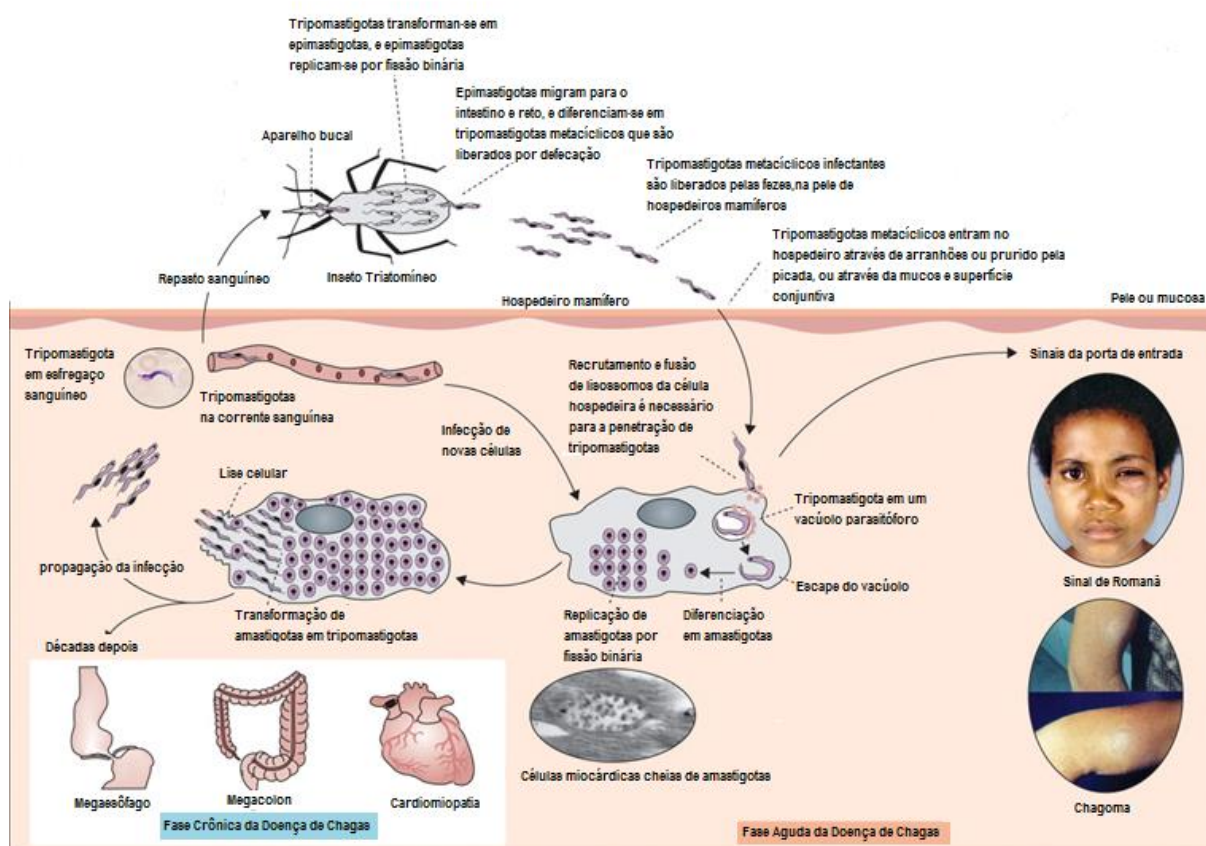
A forma epimastigota é considerada a fase transitória entre a amastigota e tripomastigota. O epimastigota tem formato fusiforme, bem alongado e membrana ondulante visível e associada ao flagelo, que emerge perto da metade da célula e alastra-se acompanhando a membrana ondulante até se tornar livre na ponta da extremidade anterior do protozoário. Apresenta uma intensa atividade reprodutiva e é encontrado, mais especificamente, no intestino do inseto vetor. A forma epimastigota, é a forma evolutiva de hospedeiros invertebrados (Martins AV *et al* 2012) (Figura 8B).

A forma tripomastigota apresenta duas formas: tripomastigota sanguíneo e tripomastigota metacíclico. O tripomastigota sanguíneo é ágil e percorre o sangue periférico do hospedeiro vertebrado. Exibe-se em forma de C ou S com extremidades afiladas e um cinetoplasto globoso. O tripomastigota metacíclico, é a forma mais infectante, e penetra as células do hospedeiro vertebrado. Resiste às altas temperaturas corporais dos hospedeiros vertebrados, e têm capacidade de atravessar mucosas além de aderir fortemente à membrana celular das células-alvo (Tyler KM *et al*, 2001) (Figura 8C).



**Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura das principais formas evolutivas do *T. cruzi*.** Em (A) forma amastigota. Em (B) forma epimastigota. Em (C) forma tripomastigota (Gonçalves *et al*, 2018).

No interior do vetor, o protozoário apresenta-se em sua forma epimastigota, e apenas no intestino posterior diferencia-se para a forma tripomastigota metacíclico, tornando-se capaz de infectar outro hospedeiro, ao ser eliminado através das fezes ou urina do vetor. Já a infecção por *T. cruzi* no homem, inicia-se após a entrada do protozoário tripomastigota metacíclico no interior do corpo do hospedeiro, onde já na corrente sanguínea, principia a invasão das células do hospedeiro. Após infectar as células do hospedeiro, o protozoário escapa do vacúolo parasitóforo, através da destruição desse vacúolo pela proteína formadora de poros (proteína Tc-Tox) e no citoplasma celular, diferencia-se em amastigota passando por sucessivas replicações (Ley V *et al*, 1990; Burleigh *et al*, 1995) (Figura 9).



**Figura 9: Ciclo evolutivo do *T. cruzi* em hospedeiro intermediário e hospedeiro definitivo.** Eliminado através das fezes ou urina do vetor hospedeiro, o protozoário em sua forma tripomastigota metacíclica adentra a pele humana, por lesão ou fissura. Ocorre, então, a invasão celular, escape do vacúolo parasitóforo e, no interior da célula infectada, a diferenciação para a forma amastigota, que passa por sucessiva replicação. Ainda no interior celular as formas amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigota e rompem a célula, extravasando para o meio extracelular e seguem para infectar novas células e tecidos. Parasitos livres na corrente sanguínea podem ser absorvidos durante o repasto sanguíneo do inseto vetor no interior deste permanecendo na forma epimastigota, diferenciando-se em tripomastigotas ao alcançar o intestino. Figura adaptada (Rassi Junior A *et al*, 2010).

Após preencher todo o citoplasma da célula, as formas amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas que rompem a membrana celular da célula hospedeira, e seguem para a corrente sanguínea, para a infecção de novas células (Tyler KM *et al*, 2001).

Entre os mecanismos de evasão conhecidos pode-se citar a produção de enzimas antioxidantes que garantem proteção contra as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio lisossomal (Piacenza L *et al*, 2008); escape do ambiente oxidativo do fagolisossomo através da ação da toxina formadora de poros (Tc-Tox) (Andrewset *et al*, 1990); inibição da ativação do Sistema Complemento (Ferreira V *et al*, 2004); renovação de moléculas de superfície, Mucinas ancoradas a GPI (GPI

mucinas), dificultando a opsonização do protozoário (Buscaglia CA *et al* 2006). Além disso, a imunossupressão do sistema imune retarda a resposta protetora, através da modulação do metabolismo lipídico e de mediadores inflamatórios imunossupressores produzidos e estocados por organelas citoplasmáticas conhecidas como Corpúsculos Lipídicos (CLs) (para revisão ver Almeida PE *et al*, 2018).

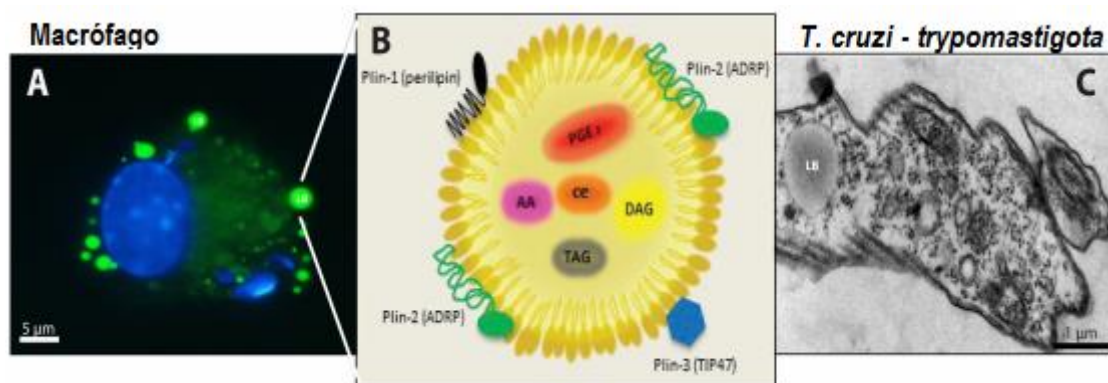
#### **1.4) A infecção por *Trypanosoma cruzi* e a biogênese de Corpúsculos Lipídicos**

##### **1.4.1) Características Gerais**

Os Corpúsculos Lipídicos (CLs) são organelas esféricas presentes no citoplasma celular de microrganismos e de células eucarióticas, responsáveis pelo metabolismo e armazenamento lipídico. Também conhecidos como adipossomas, são revestidos por uma monocamada externa formada por fosfolípidos (Tsuchi-Sato K *et al*, 2002; Bartz R *et al*, 2007) e proteínas estruturais e funcionais. De maneira geral, os CLs apresentam um núcleo formado por lipídeos neutros, como triacilgliceróis (TAGs) e ésteres de esterol (EE) (Kuerschner L *et al*, 2008; Czabany T *et al*, 2008; Cheng J *et al*, 2009), e diversas outras moléculas (Figura 10).

As principais proteínas associadas aos CLs descritas atualmente são as proteínas da família PAT, que compreende as perilipinas (PLIN): Perilipina 1 (PLIN 1), Perilipina 2 (PLIN 2), também conhecida como proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos (ADRP) ou adipofilina; Perilipina 3 (PLIN 3), também conhecida como proteína de interação da porção terminal de 47 quilodaltons (TIP47), S3-12 e OXPAT (Digel *et al*, 2010, Skinner *et al*, 2013; Mahajan *et al*, 2015). Presente tanto na superfície dessas organelas, quanto em seu interior, essas proteínas estão relacionadas na montagem, estocagem, biogênese e incorporação e acúmulo de lipídeos em diferentes tipos de células (revisão em Almeida PA *et al*, 2018).





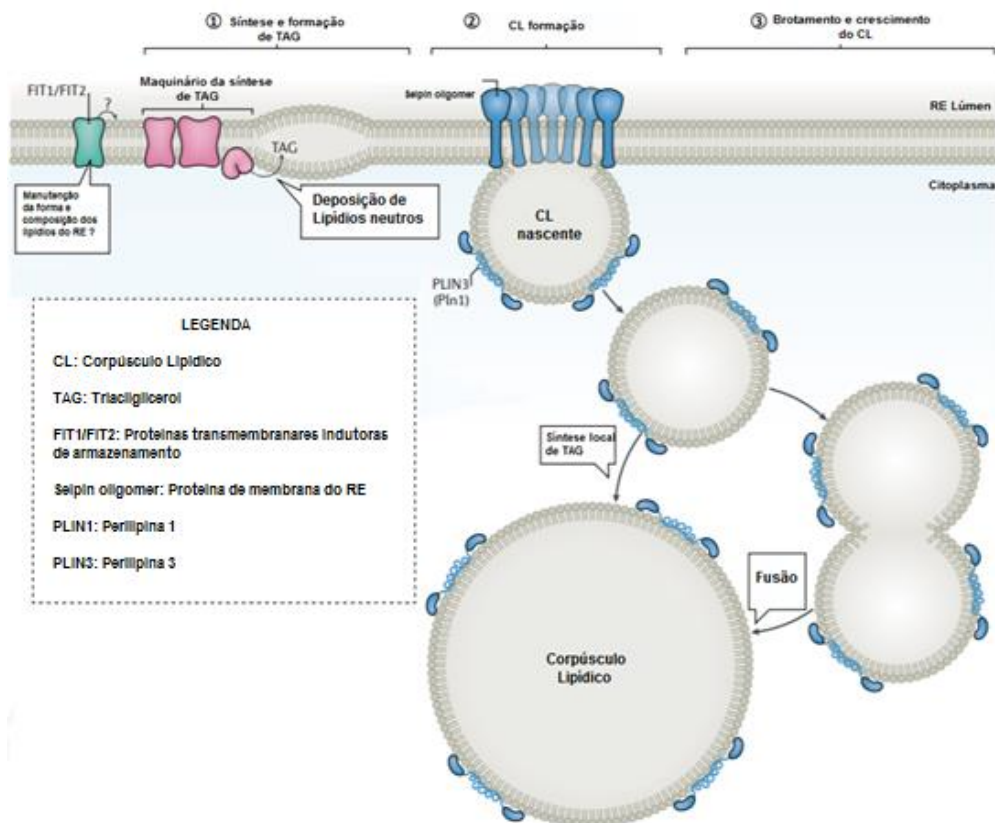
**Figura 10: Aspectos morfológicos de Corpúsculos lipídicos (CLs).** Em (A), Imunofluorescência mostrando o acúmulo de CLs (verde) em macrófagos infectados murinos após coloração com BODIPY R 493/503. Núcleos de macrófagos e parasitos internalizados foram corados com DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole) (azul). Em (B) desenho esquemático ilustrando a estrutura e composição de CLs. Estas organelas encontram-se delimitadas apenas por uma monocamada de fosfolípidiose principalmente proteínas da família PAT. Em seu núcleo pode se encontrar prostaglandina E2 (PGE2), ácido-araquidônico (AA), diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TAG) e estéreis de colesterol (CE). Em (C) Microscopia eletrônica mostrando um CL em um tripomastigota de *T. cruzi*. LB- Corpúsculo Lipídico (Almeida PA *et al*, 2018).

Outras proteínas também fazem parte do conteúdo protéico dos corpúsculos lipídicos como proteínas da família das Rabs, fator de ribosilação de ADP (ARF), pequenas GTPases, tubulina-1 e caveolinas, relacionadas ao tráfico vesicular, fusão de membranas e de associação ao citoesqueleto (Blanchette-Mackie EJ *et al*, 1995; Bartz R *et al*, 2007; Ozeki S *et al*, 2005); proteínas envolvidas na sinalização celular como proteínas-quinases (Fujimoto T *et al* 2004), proteínas e enzimas envolvidas com a homeostase lipídica como lipases, fosfolipases (Brasaemle DL *et al*, 2004; Fujimoto T *et al*, 2001), acetil-CoA sintetase, acetil-CoA carboxilase, esqualeno epoxidase, lanosterol sintase, triglicerídeo lipase, álcool desidrogenase. Além disso, os CLs são também depósitos intracelulares de Ácido Araquidônico (AA) e proteínas envolvidas na síntese de eicosanoides, como fosfolipases A Ciclooxygenases (COXs), 5 e 15- lipooxygenases (5-LO e 15-LO), leucotrieno C4 sintase e MAP-quinases e prostaglandinas (PGE's) (Bozza P *et al*, 1998; D'Ávilla H *et al*, 2011).

Os CLs podem apresentarem-se elétron-densos, abundante em fosfolípidios, ou elétron-lúcidos, abundante em lipídeos neutros. O número, tamanho, o conteúdo e elétron-densidade dos CL podem variar de acordo o tipo e função celular e a condição e estímulos às quais a célula foi submetida (revisado por Bozza P *et al*, 2007).

Atualmente considera-se que a biogênese dos CL em células eucarióticas inicia-se com o acúmulo de moléculas de lipídeos neutros entre a bicamada fosfolipídica do Retículo Endoplasmático (RE), e quando essa retenção atinge o limite, essa região desprende-se do RE, dando origem ao CL (Figura 11). A forma como esse desprendimento ocorre ainda é desconhecida, porém a teoria mais aceita sugere que esse processo pode ocorrer por brotamento do folheto citosólico mediado pelas proteínas perilipinas em áreas específicas do RE (revisto em Guo Yi *et al*, 2009).

Neste modelo as enzimas de síntese de triacilglicerol (TAG) e de síntese de éster de colesterol depositam lipídios neutros entre os folhetos do RE. A forma e a composição no folheto do RE provavelmente são afetadas pelas proteínas transmembranares 1 e 2 (FIT1/FIT2), indutoras do armazenamento de lipídeos. Proteínas como a seipin oligomer e outros fatores importantes da biogênese dos CLs como perilipinas 1 e 3 são recrutados para o local e facilitam o crescimento do CL nascente. Quando a deposição de lipídeos alcança uma concentração limite, a região do RE com o acúmulo se desprende, envolta em uma monocamada fosfolipídica proveniente do folheto citoplasmático do RE (revisto em Olzmann *et al*, 2019). Após formados os CLs podem aumentar seu volume, por síntese localizada de lipídeos ou por fusão (Olofsson *et al.*, 2009).



**Figura 11: Desenho esquemático do modelo de biogênese de CLS.** Modelo do domínio RE, onde ocorre o brotamento do CL pelo folheto citosólico. Proteínas transmembranares 1 e 2 (FIT1/FIT2) e o maquinário da síntese de TAG depositam lipídios neutros entre os folhetos do RE. Seipin oligomer e outros fatores importantes da biogênese dos CLs como perilipinas 1 e 3 são recrutados para o local e facilitam o crescimento do CL nascente. Após uma concentração limite o CL se desprende, aumentando ou não seu volume por síntese localizada de lipídeos ou por fusão. Figura adaptada (Olzmann *et al*, 2019).

#### 1.4.2) Corpúsculos Lipídicos e infecções

Atualmente estudos têm demonstrado que os CLs são organelas importantes envolvidas em infecções causadas por diversos patógenos como parasitos, bactérias e vírus durante a infecção celular. Trabalhos realizados com *Mycobacterium bovis* BCG demonstraram que o microrganismo induz a biogênese de CLs, mediada por receptores do tipo Toll 2 (TLR2) (D'Avila *et al*, 2006), como também pela via de sinalização relacionada com a ativação do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomos-gamma (PPAR $\gamma$ ) em macrófagos (Almeida PE *et al*; 2009, Almeida *et al*, 2014). Durante a infecção em células HeLa por *Chlamydia trachomatis*, observou-se um aumento na quantidade de CLs, utilizados pelo parasito como fonte de lipídeos e proteínas (Kumar Y *et al*, 2006). Na infecção por *Mycobacterium leprae* em macrófagos e em células de *Schwann*, o aumento na produção de CLs e na

liberação de PGE<sub>2</sub> também foi detectado (Mattos KA *et al*, 2010, Mattos KA *et al*, 2011, Mattos KA *et al*, 2012).

Em infecções por protozoários a participação de CLs também tem sido documentada. Notou-se que a infecção por *Plasmodium berguei* induziu a formação de grande quantidade de CLs, em hepatócitos (Rodriguez-Acosta A FH *et al*, 1998). Na infecção por *Leishmania amazonenses* em macrófagos, observou-se um aumento numérico dos CLs (Pinheiro RO *et al*, 2009). Além disso, um estudo demonstrou que no decorrer da infecção por *Toxoplasma gondii* em células musculares, houve um aumento na biogênese de CLs (Gomes A *et al*, 2014).

Dados do nosso grupo mostraram que a infecção por *T. cruzi* em macrófagos murinos induziu um aumento na biogênese de CLs, sendo essa modulação realizada pela interação entre o protozoário e a célula hospedeira, através do reconhecimento de moléculas da superfície do parasito por receptores Toll Like-2 (TLR-2) (D'Ávila H *et al*, 2011). Além disso, a ativação desse receptor induziu o aumento de PGE<sub>2</sub>, produzido no interior de CL e responsável por suprimir seletivamente as funções efetoras de macrófagos e neutrófilos e a imunidade mediada por células Th1, e NK, além de modular a produção de quimiocinas, inibindo a atração de células pró-inflamatórias, favorecendo assim a persistência do parasito (Kalinski, 2012; Toledo DAM *et al*, 2016).

Além da indução de CLs na célula hospedeira, diversos protozoários já demonstraram a presença dessas organelas em sua constituição. Estudos comprovaram a existência de CLs no citoplasma de *Leishmania donovani* (Flaspohler *et al*, 1997) e em parasitos do gênero *Plasmodium*, e *Trypanosoma*, como no *Trypanosoma cruzi* (Figura 10C) (Toledo DAM *et al*, 2016 Almeida *et al*, 2018, Valochi *et al*, 2018). Acredita-se que nos parasitos o CL pode atuar como fonte de carbono (De Souza, 2009) e de lipídeos (Charron AJ *et al*, 2002; der Meer-Janssen V *et al*, 2010). Além disso, o trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa demonstrou que os CLs do parasito são sítios de síntese de PGE<sub>2</sub> pelo próprio parasito (Toledo DAM 2016).

Diante dos diversos trabalhos que ressaltam a importância da biogênese de CLs nos processos patológicos e infecciosos, os quais são capazes de fornecer substrato para a geração de energia e produção de mediadores lipídicos, e às evidências em relação à importância da modulação dessa organela durante a infecção promovida pelo *T. cruzi*, este trabalho visa, pela primeira vez, explorar o papel da biogênese de CLs induzida por *T.cruzi* em mioblastos e miotubos (células musculares diferenciadas), sua participação no reparo de membrana e se o LBP poderia modular esses mecanismos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Investigar o efeito do Laser de Baixa Potência no mecanismo de reparo de membrana plasmática e na biogênese de Corpúsculos Lipídicos na ausência ou não de infecção celular por *T. cruzi* em mioblastos e miotubos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar a diferenciação de mioblastos C2C12 em miotubos;
- Analisar a presença de cavéolas nas células musculares de forma basal;
- Analisar se o LBP induz reparo de membrana em células musculares;
- Quantificar a internalização de parasitos na ausência ou presença de estimulação prévia com o LBP de células musculares infectadas *in vitro* por *T. cruzi*;
- Analisar se a infecção *in vitro* de células musculares por *T. cruzi* induz a biogênese de Corpúsculos Lipídicos;
- Analisar a biogênese de Corpúsculos Lipídicos em células musculares, na presença ou ausência de infecção *in vitro* por *T. cruzi* após a irradiação com LBP;
- Analisar a produção de mediadores inflamatórios por células musculares infectadas *in vitro* por *T. cruzi*;
- Avaliar os níveis de mediadores inflamatórios em células musculares infectadas *in vitro* por *T. cruzi* após a irradiação com LBP.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1) Padronização de miotubos**

##### **3.1.1) Cultura *in vitro* de C2C12**

Mioblastos da linhagem celular C2C12, um subclone de células C2 de músculo esquelético dos camundongos (Blau *et al*, 1983), foram gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Andréa Henriques Pons (Fiocruz). Os mioblastos C2C12 foram mantidos a 37°C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, em meio de manutenção Meio Dulbecco MEM (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico penicilina + estreptomicina (PS), alcançando, no máximo, 60-70% de confluência. A repicagem das células foi feita a cada 2-3 dias.

Após a tripsinização, as células foram centrifugadas em tubo falcon a 1500 RPM, 4°C por 5 minutos, ressuspensas em meio DMEM suplementado (10% de SFB e 1% de PS), plaqueadas em placas de 6 poços ou em garrafas de cultura de 75 cm, na concentração de 1x10<sup>5</sup> células/poço, e mantidas até que formassem uma monocamada confluenta. Depois de alcançar a confluência, geralmente no terceiro dia após o plaqueamento, o meio de cultura foi trocado por DMEM contendo 2% ou 10% de soro de cavalo (SFC), 1% PS, para induzir a diferenciação miogênica. As células foram mantidas nesta condição por até 10 dias, com meio novo sendo adicionado a cada 48 horas.

##### **3.1.2) Microscopia de luz**

Para padronização dos miotubos por microscopia de luz foram obtidas imagens das culturas de miotubos nos dias subsequentes a indução da diferenciação miogênica com diferentes meios de diferenciação (contendo 2% ou 10% de SFC), em placas de 6 poços ou em garrafas de cultura de 75 cm. As imagens foram adquiridas através do microscópio invertido Nikon Eclipse TI, sob objetiva de 40x e software CellSens Dimension.

### 3.1.3) Imunofluorescência

Para padronização dos miotubos por imunofluorescência as culturas de miotubos foram fixadas em formalina 3,7% por 10 min. Em seguida as células foram lavadas com PBS (1x) por duas vezes e permeabilizada com Triton (0,1%) por 10 a 15 minutos. Posteriormente foi aplicada a solução de bloqueio BSA 3% (em PBS) por 20 minutos e após esse tempo lavadas com PBS (1x). As células foram incubadas com o anticorpo anti-Cav-3 (BD Biosciences), na concentração de 250 µg/ml, por uma hora em temperatura ambiente. Logo após esse período, as células foram incubadas com o anticorpo secundário Cys 3 (Donkey Anti-Mouse) por uma hora. Posteriormente as amostras foram montadas com solução de montagem Vecta Shield acrescida com DAPI (para marcação do núcleo). As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência invertido Nikon TS100, com objetiva de 40x e software CellSens Dimension.

### 3.1.4) Western Blot

O lisado celular foi obtido com 70 µL de tampão de amostra (Trizma base 3g, água Milli Q 40 mL, glicerol 40 mL, SDS 8g, β-Mercapto Etanol 20 mL, Azul de Bromofenil 250 µl), após lavagem com PBS estéril e fervido em seguida a 90°C por 5 minutos. As proteínas totais foram posteriormente submetidas à eletroforese em SDS-PAGE (50 µL de amostra em gradiente de acrilamida 10%, 125 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos) e transferida para uma membrana de nitrocelulose umedecida em tampão de transferência (100 mL de 25 mM Tris, 192 mM glicina pH 8 quando dissolvidos em 80 mL de H<sub>2</sub>O MiliQ e 20 mL de metanol).

A transferência foi feita a 90 Volts, por 2 horas. Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h ou por 16 h com solução bloqueadora de leite 5% em TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20). Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST, e incubada por 16 h com o anticorpo primário anti-Caveolina 3 (clone X, ou clone E8 Santa Cruz Biotechnology) 200 µg/ml. Como controle positivo experimental, usamos um anticorpo monoclonal anti-β-actina (BD Transduction Laboratories) na concentração de 250 µg / mL 1:5.000.



Após este tempo, as membranas foram lavadas com TBST, e as proteínas de interesse foram então identificadas pela incubação da membrana com anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo (Pierce), concentração de 2µg/mL ou 1 µg / mL conjugado a peroxidase (HRP) respectivamente, diluídos na hora do uso na concentração de 1:20.000 anti-coelho ou 1:15.000 anti-camundongo. Todos os anticorpos primários e secundários foram diluídos em TBST. A detecção foi feita com o sistema de análise de “Western blotting “Supersignal Chemiluminescence” (Pierce) e a membrana exposta a filme de autoradiografia (Amersham Hyperfilm ECL – High performance chemiluminescence film) GE Healthcare Limited.

### 3.1.5) Microscopia eletrônica de transmissão

Os mioblastos ou miotubos, no quarto dia de diferenciação, foram fixados em 0.2% glutaraldeído em 0,1 M tampão cacodilato por 1 h a temperatura ambiente e processadas para MET (Universidade de Maryland em College Park, EUA) como descrito em (Parton *et al*, 2002). Foram observadas as vesículas do tipo cavéola com diâmetro inferior a 80 nm (medido com a ferramenta de linha ImageJ, NIH).

### 3.2) Laser de Baixa Potência

As culturas de mioblastos em miotubos no 7º dia de diferenciação foram irradiadas utilizando um Laser de Baixa Potência (Photon Laser III DMC, Equipamentos LTDA São Carlos, Brasil), nos parâmetros listados na tabela 1. A irradiação foi aplicada pontualmente, abrangendo todo o diâmetro do poço (34.8 mm), sendo feita na penumbra para evitar a influência de outras fontes de luz.

**Tabela 1** – Parâmetros dosimétricos utilizados para irradiação com o LBP.

Comprimento de onda (nm) (Infravermelho)	Potência de saída (mW)	Distância entre o laser e o meio de cultura (cm)	Dose (J/cm <sup>2</sup> )	Energia (J)	Tempo de irradiação (segundos)	Modo	Nº de sessões
808	100	8	30	0,7	8	Contínuo	1

### 3.3) Análise do reparo de membrana- Coloração com Iodeto de Propídio

Para as análises de reparo de membrana, mioblastos ou miotubos no 7º dia de diferenciação foram lavados 3 vezes com 1000 µl de meio DMEM sem Ca<sup>2+</sup>, com EGTA (quelante de Ca<sup>2+</sup>) a 10 Mm ou com 1000 µl de meio DMEM contendo Ca<sup>2+</sup>. Em seguida as células foram irradiadas com o LBP nos parâmetros descritos previamente, em temperatura de 4°C, para inibição da endocitose durante o período de irradiação.

Quatro minutos após a irradiação, o meio foi retirado e substituído por 1000 µl de meio DMEM com Ca<sup>2+</sup> ou DMEM sem Ca<sup>2+</sup>, ambos contendo DAPI. Em seguida, as placas foram deixadas por cinco minutos a temperatura de 37°C e após acrescentado solução de Iodeto de Propídio (IP) a 30 µl/ml. Após quatro minutos as células foram analisadas utilizando o microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100 sob objetiva de 40x, e software CellSens Dimension.

As quantificações foram feitas em triplicata, contando todos os núcleos corados com IP em 5 campos aleatórios quando miotubos, e por 50 núcleos quando mioblastos. O número de núcleos positivos para IP foi representado graficamente.

### 3.4) *Trypanosoma cruzi* infecção *in vitro*

Os parasitos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Célio Freire-de-Lima (UFRJ). Culturas de *T. cruzi* clone Dm 28c foram incubadas em meio de infusão BHI (Brain Heart Infusion) à 27°C contendo cerca de 100% de epimastigotas. Posteriormente os parasitos foram diluídos em meio artificial que simula a urina de triatomíneo (TAUP) (190 mM NaCl, 8 mM de tampão de fosfato pH 6,0, 17 mM KCl, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) suplementado com 2,5% (v / v) de bicarbonato de sódio a 1,4%, 10 mM de L-prolina, para uma concentração final de 5 x 10<sup>6</sup> parasitos/mL para a sua diferenciação em sua forma tripomastigota metacíclica. Após 3 - 4 dias de diferenciação, os parasitos incubados em TAUP foram centrifugados a 3000 rpm durante 15 min à temperatura ambiente e ressuspensos em meio DMEM sem SFB.

### 3.5) Grupo Experimental

O *T. cruzi*, diferenciado em sua forma tripomastigota metacíclica, foi adicionado as culturas de mioblastos ou de miotubos no 7º dia de diferenciação, em Multiplicidade de infecção (MOI) de 3:1 (mioblastos) ou 10:1 (miotubos), as quais foram ou não irradiadas previamente a infecção com o LBP nos parâmetros já descritos. Após a irradiação as culturas foram mantidas por 24 horas, em placas de 6 poços, e após esse período, os parasitos não internalizados foram removidos através da lavagem com PBS e as células foram incubadas por mais 24 horas e posteriormente fixadas com formalina a 3,7% para futuras análises. Como controle foram utilizadas culturas de mioblastos e miotubos irradiadas ou não previamente com o LBP, não infectadas com *T. cruzi*.

### 3.6) Quantificação da infecção por *T. cruzi* em células musculares infectadas

As culturas de mioblastos ou miotubos, mantidas em placas de 6 poços, estimuladas ou não com o LBP nos parâmetros estabelecidos acima, foram infectadas com *T. cruzi* diferenciado em sua forma tripomastigota metacíclica, na Multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1 (miotubos) ou 3:1 (mioblastos). 24 horas após a infecção, os parasitos não internalizados foram retirados pela lavagem com PBS e as células foram incubadas por mais 24 horas e em seguida fixadas com formalina a 3,7%.

Posteriormente as amostras foram coradas com DAPI (VECTASHIELD® mounting medium containing DAPI 4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para a marcação dos protozoários internalizados das células infectadas. As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100, com objetiva de 40x e software CellSens Dimension. O número de parasitos intracelulares foi determinado contando 55 núcleos infectados quando miotubos, e 50 células individuais infectadas quando mioblastos. A contagem foi realizada utilizando o software ImageJ. O número de parasitos internalizados foi representado graficamente.

### **3.7) Análise e Contagem de Corpúsculos Lipídicos**

Para análise da biogênese de CLs, as culturas de mioblastos ou de miotubos no 7º dia de diferenciação, foram irradiadas com LBP nos parâmetros dosimétricos estabelecidos acima e logo em seguida, os mioblastos/miotubos foram infectados ou não com *T. cruzi*.

As células foram fixadas em formalina 3,7% por 24 horas, seguido com a coloração usando Oil Red O. A solução estoque de Oil Red O (Sigma Aldrich) foi preparada a 0,3% (0,3 g de Oil Red O/100 mL de isopropanol (ácido isopropílico) (Sigma-Aldrich), filtrada e acondicionada em temperatura ambiente. No dia da coloração, a solução de uso foi preparada diluindo-se a solução estoque em água destilada na proporção 3:2. Concluída a diluição, a solução foi novamente filtrada e utilizada para a coloração de corpúsculos lipídicos, na própria placa de cultura. 300 µl da solução de uso de Oil Red O, foram utilizados, por 5 minutos, no escuro. Após esse tempo, as células foram lavadas em sequência 2 vezes com água destilada, isopropanol 30% e PBS 1%. Os poços foram montados com meio de montagem contendo DAPI (VECTASHIELD® mounting medium containing DAPI 4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Vector Laboratories) para a marcação do núcleo das células. As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100, com objetiva de 40x e software CellSens Dimension.

As quantificações foram feitas em triplicatas, contando todos os núcleos corados com DAPI em 5 campos aleatórios, totalizando 60 núcleos por campo, quando miotubos, e 50 células individuais quando mioblastos. A contagem foi realizada utilizando o software ImageJ. O número de CLs foi representado graficamente.

### **3.8) Dosagem de citocinas**

Os níveis das citocinas IL-6, IL-10 TNF- $\alpha$  foram quantificados no sobrenadante de mioblastos e miotubos, através da técnica de ELISA e segundo o protocolo oferecido pela fabricante (R&D Systems). A quantificação foi mensurada a partir das

curvas padrão proveniente da diluição realizada. A leitura foi realizada em 450 nm utilizando o programa Softmax Pro.

### **3.9) Análise Estatística**

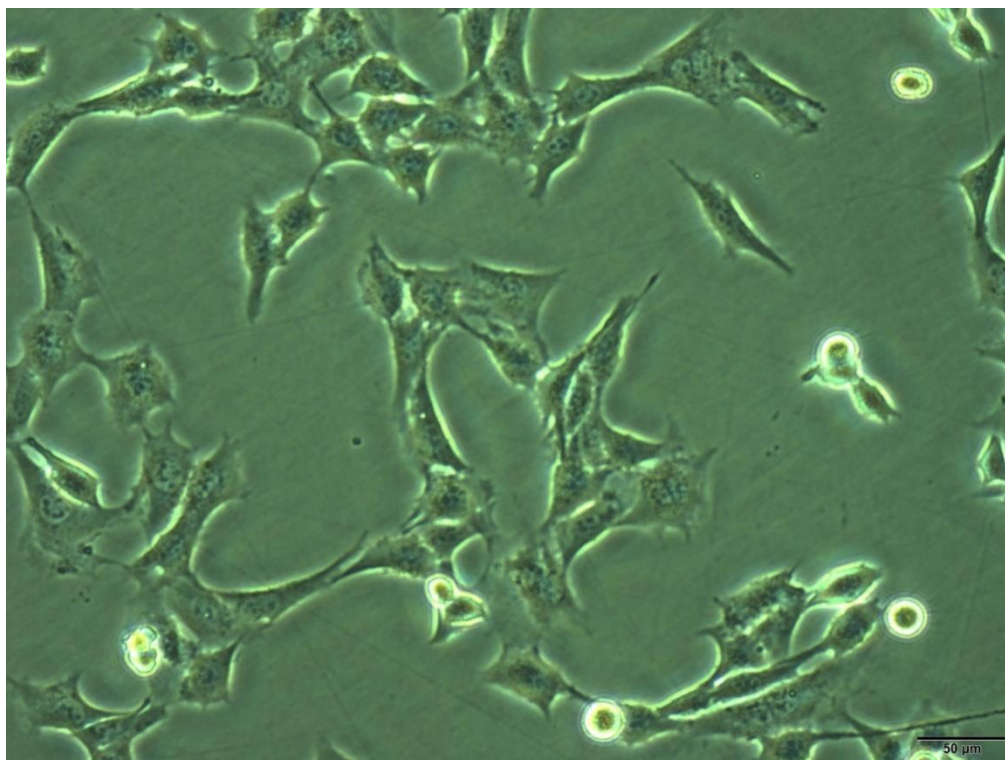
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) segundo ANOVA seguido pelo pós-teste t de Student, significância  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism®7(GraphPad Software).

## 4. RESULTADOS

### 4.1) Padronização e caracterização de miotubos a partir de células C2C12

Primeiramente foi confirmado e padronizado a diferenciação de mioblastos da linhagem C2C12 em miotubos. Para isso, as diferenças na morfologia foram avaliadas no dia 0 ao dia 11 de diferenciação miogênica. Para determinar qual o melhor meio de suplementação para a diferenciação celular, diferentes concentrações de Soro Fetal de Cavalo (SFC) foram utilizadas. As análises foram feitas através de Microscopia de luz (campo claro) e por Microscopia de Fluorescência, de culturas realizadas em garrafa de 75 cm<sup>2</sup> e em placas de 6 poços, suplementadas com 2% ou 10% de SFC.

Durante o período que antecede os estágios de diferenciação celular, as células apresentaram características morfológicas típicas de mioblastos, ou seja, alongadas, com citoplasma abundante, núcleo grande e fusiforme além de vários prolongamentos (Figura 12).

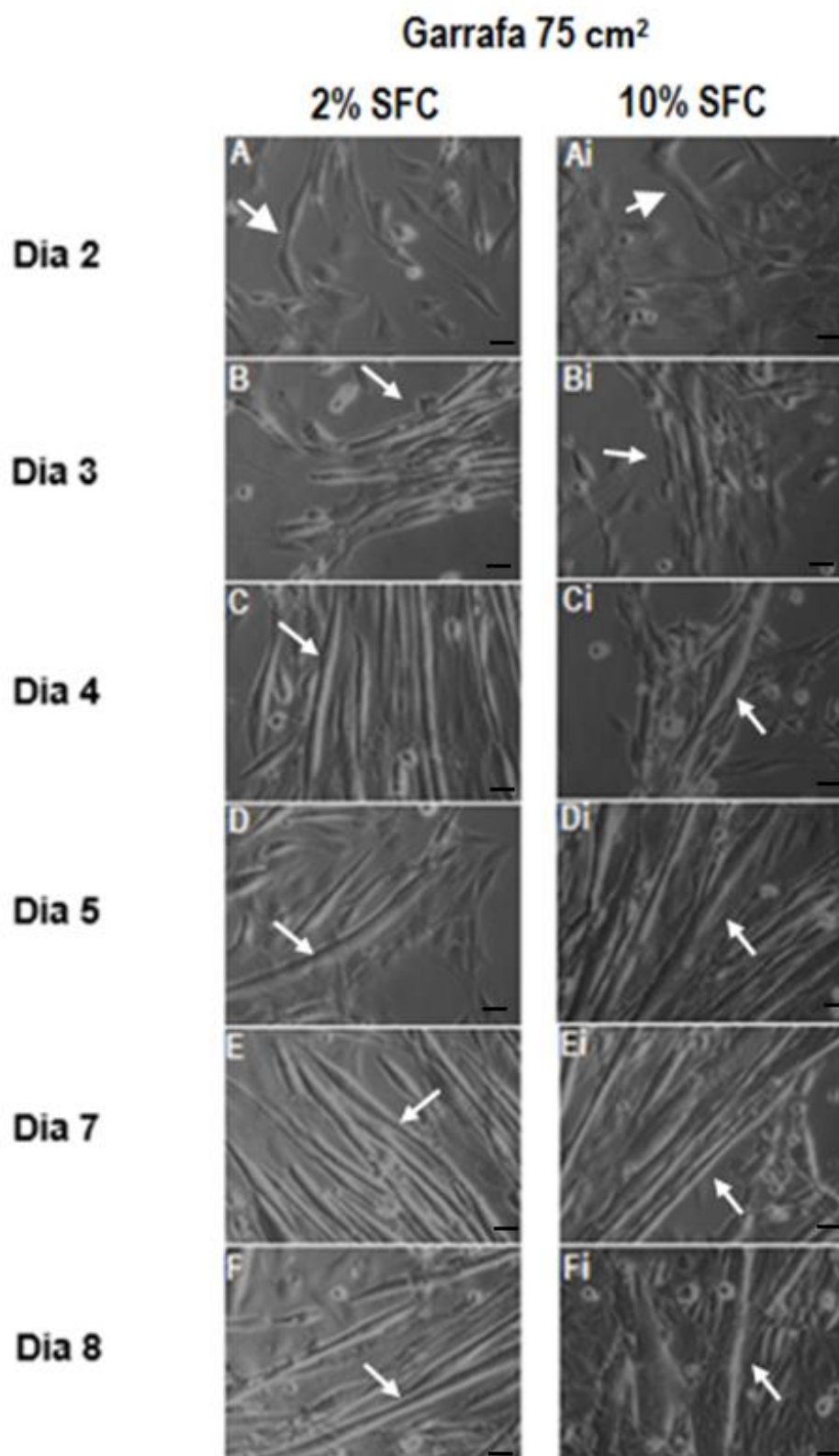


**Figura 12: Imagem representativa de mioblastos não diferenciados observados com microscopia de luz.** Observa-se células alongadas, com citoplasma abundante, núcleo grande e fusiforme além de prolongamentos (Barra=50  $\mu\text{m}$ ).

Em garrafa de 75  $\text{cm}^2$ , as células suplementadas com diferentes concentrações de SFC não apresentaram nenhuma distinção significativa na confluência e diferenciação celular. A partir do 2º dia em que as células C2C12 foram submetidas ao processo de diferenciação, mudanças na morfologia celular foram observadas (Figura 13 A e Ai), e a partir no 3º dia de diferenciação características típicas de miotubos, como a forma alongada em sentido único, e múltiplos núcleos (Figura 13C e 13Ci), ficaram mais evidentes. No 7º dia, a cultura apresentou-se totalmente diferenciada (Figura 13E e 13Ei). Não foram observadas diferenças morfológicas entre os miotubos diferenciados em garrafas ou em placas de 6 poços.

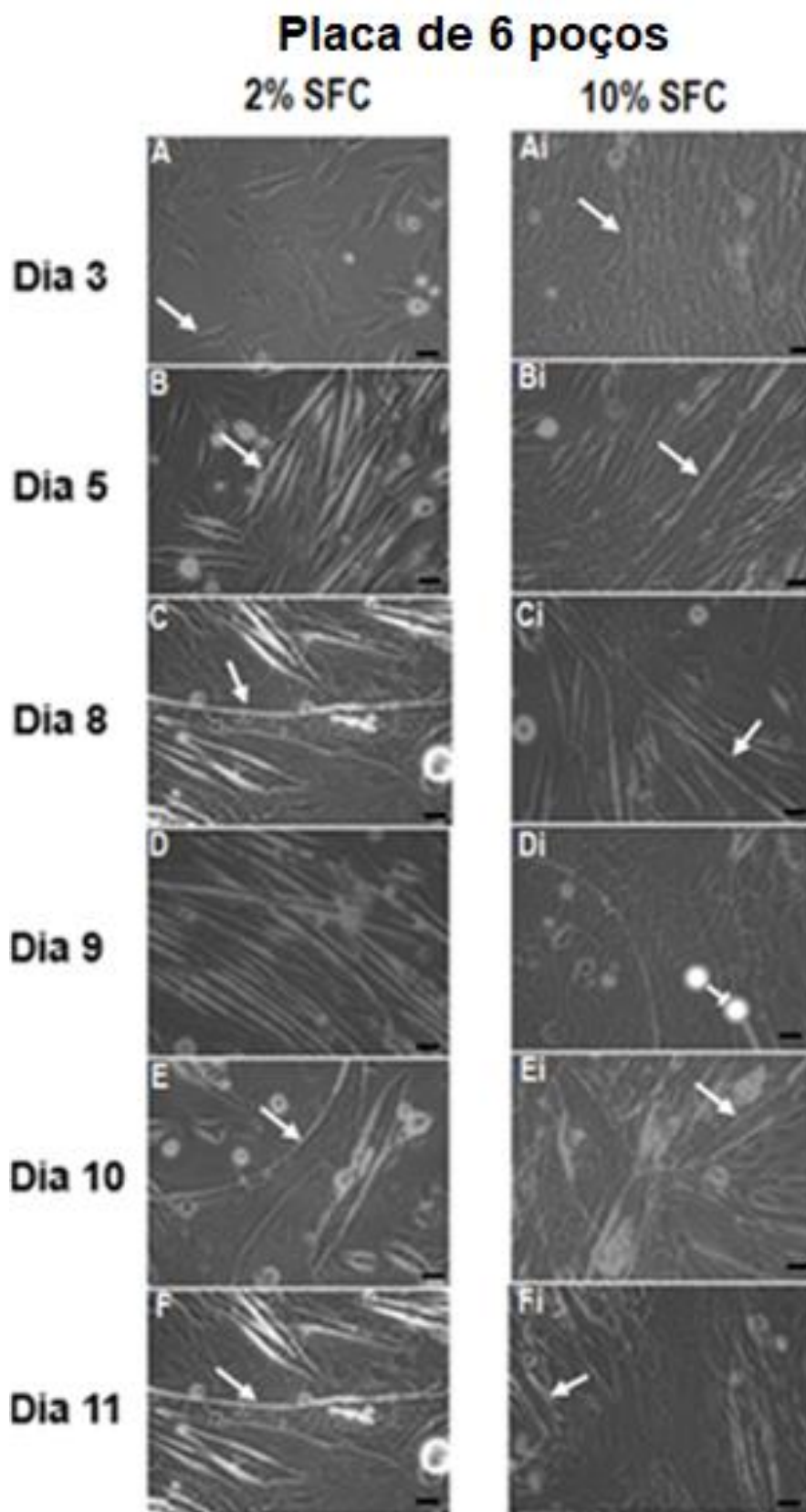
Em placa de 6 poços foi observado uma maior expansão de células em cultura suplementada com 10% de SFC, o que pode prejudicar o desenvolvimento do experimento ao formar um tecido muscular mais rapidamente, e a presença de miotubos pode ser notada a partir do 5º dia de diferenciação em ambas as culturas (Figura 14B, 14Bi).

Com os resultados obtidos, foi determinada a melhor concentração de SFC para suplementação do meio de diferenciação miogênica, sendo escolhido para isso a concentração de SFC a 2%, já que com uma menor quantidade, pode-se obter miotubos com êxito.



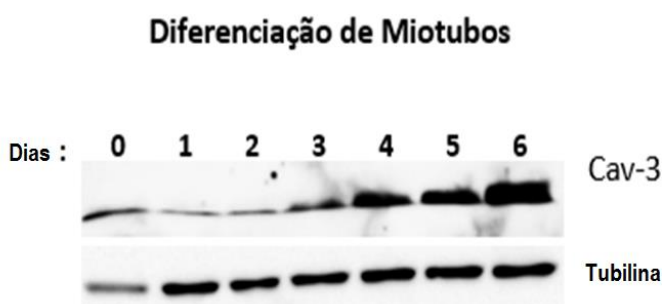
**Figura 13. Imagem representativa da diferenciação miogênica realizada em garrafa de cultura de 75 cm<sup>2</sup> com meio DMEM suplementado com SFC a 2% e 10% observada por microscopia de luz.** Cultura de C2C12 exibindo a alteração morfológica das células musculares nos dias 2, 3, 5, 7 e 8 de diferenciação miogênica. Inicialmente, com citoplasma abundante, núcleo grande e fusiforme e presença de prolongamentos (cabeça de seta), as células passam a apresentar com o passar dos dias uma forma mais alongada em sentido único, e múltiplos núcleos, constituindo assim miotubos diferenciados (setas) (Barra = 50 µm).



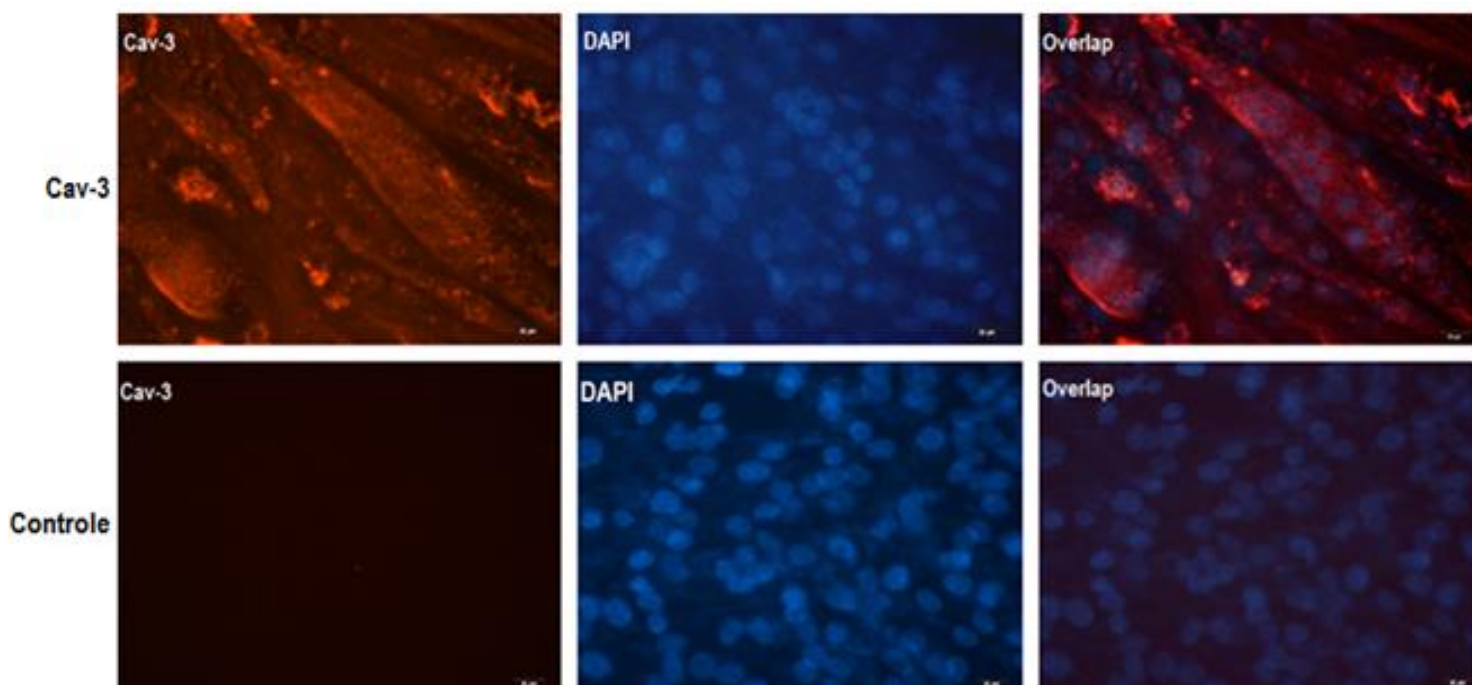


**Figura 14. Imagem representativa da diferenciação miogênica da diferenciação miogênica realizada em placa de 6 poços com meio DMEM suplementado com SFC a 2% e 10% observada por microscopia de luz. Cultura de C2C12 exibindo a alteração morfológica das células musculares nos dias 3, 5, 8, 9 e 10 de diferenciação miogênica (setas). A cultura suplementada com SFC a 10% apresenta visualmente uma maior confluência celular (Barra = 50µm).**

Ainda na padronização da cultura de miotubos, foi realizada análise de Western Blot (Figura 15) e Imunofluorescência (Figura 16), para verificação da expressão de caveolina-3 (Cav-3), um dos marcadores específicos de células musculares diferenciadas. Os resultados obtidos por Imunofluorescência mostraram a expressão intensa de Cav-3 nas células musculares que foram diferenciadas, sendo essa expressão observada no Western Blot já a partir do quarto dia de diferenciação.



**Figura 15: Miotubos apresentam marcadores de células musculares como Cav-3.** Western Blot mostrando a expressão de Cav-3 ou tubulina, durante a diferenciação de mioblastos C2C12 induzidas pela privação de soro, pode-se observar um aumento gradual na expressão da Cav-3.

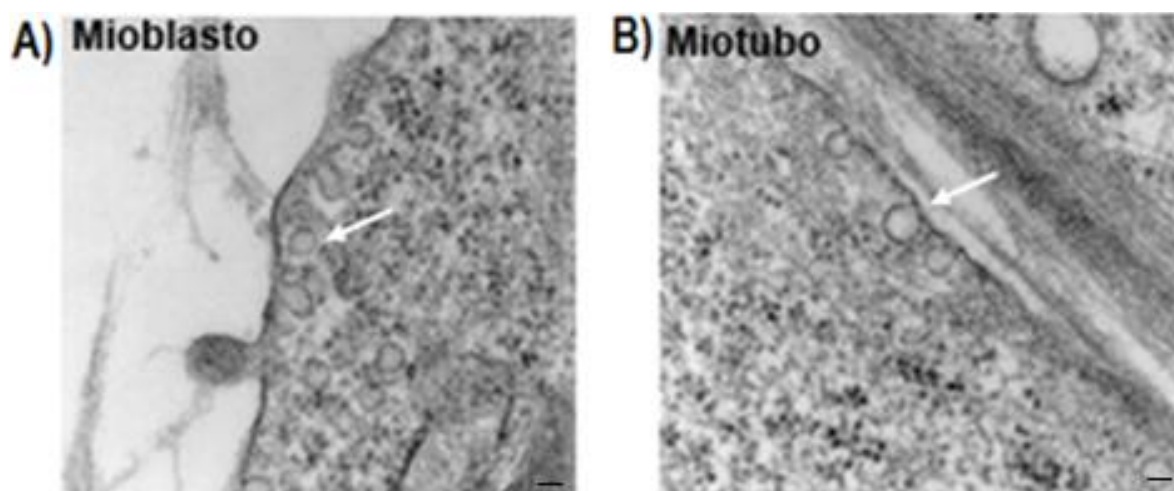


**Figura 16: Imagens representativas demonstrando a expressão de Cav-3 em miotubos observada por microscopia de fluorescência.** Pode-se observar a expressão da Cav-3 nas células musculares em seu 7º dia de diferenciação. Os miotubos foram fixados, permeabilizados, marcados com anticorpos anti-Cav-3 (vermelho) e analisados por microscopia de fluorescência. As células foram coradas com DAPI para marcação dos núcleos (Barra = 20 µm).

Com os resultados obtidos foi comprovado o êxito na diferenciação e obtenção de mioblastos em miotubos, células as quais foram utilizadas em experimentos posteriores.

#### 4.2) Mioblastos e miotubos com a MP íntegra, apresentam formação de cavéolas de modo basal.

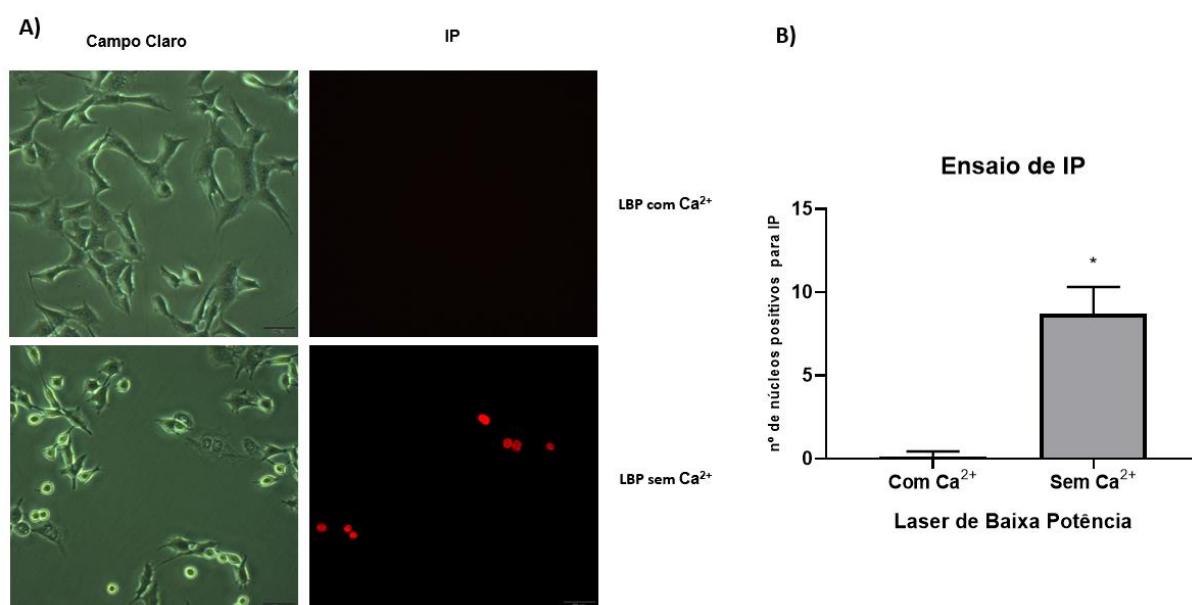
Através da Microscopia Eletrônica de Transmissão, observou-se que mioblastos e miotubos cultivados *in vitro*, apresentaram pequenas invaginações em forma de bulbo localizadas perto ou próximas a superfície da MP (Figura 17), indicando a presença de cavéolas, mesmo na ausência de lesão na membrana. Aqui, nossos resultados mostram que células musculares apresentam a formação de cavéolas em sua MP íntegra, de modo basal.



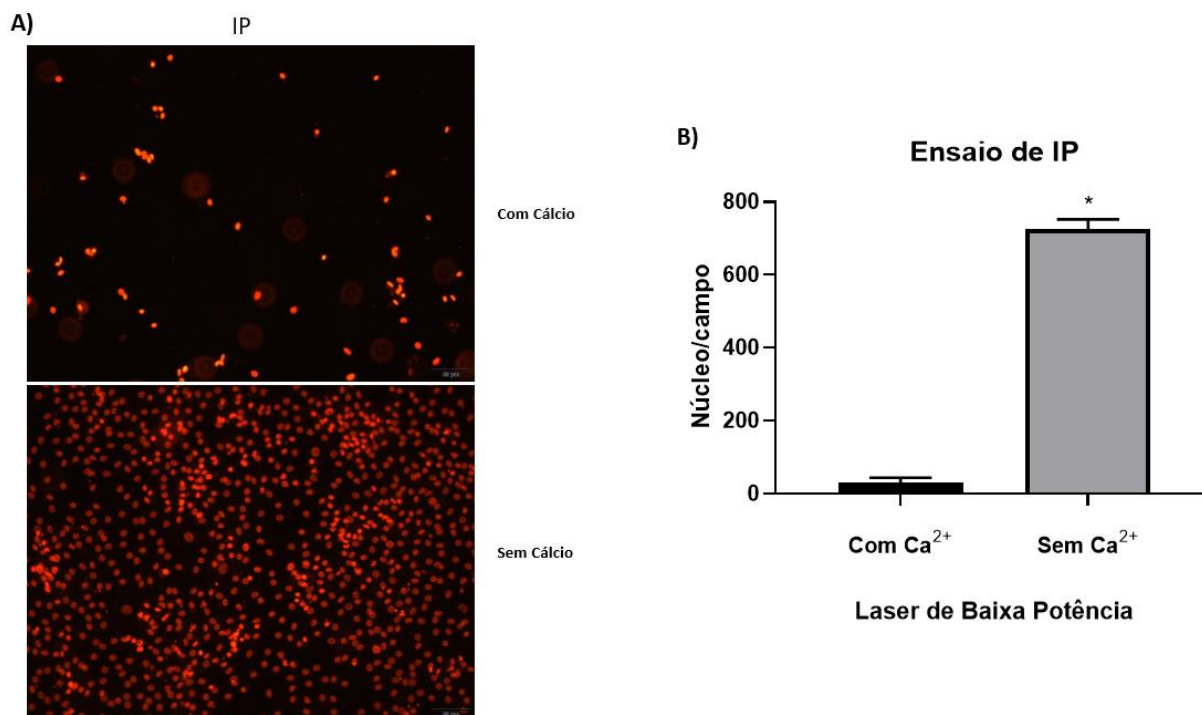
**Figura 17: Imagens representativas demonstrando células musculares indiferenciadas (A) e diferenciadas (B) apresentam a formação de cavéolas em condições normais. MET da MP íntegra de mioblastos e de miotubos mostra a presença de cavéolas na bicamada lipídica, representada na imagem por pequenas invaginações na membrana (setas)(Barra=100nm).**

### 4.3) Células musculares irradiadas com LBP, na presença ou ausência de $\text{Ca}^{2+}$

Para observar a ação do LBP na MP e indução do mecanismo de reparo, culturas de mioblastos e miotubos foram irradiadas em meio contendo  $\text{Ca}^{2+}$  ou em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  na dose de  $30 \text{ J/cm}^2$ . As análises de fluorescência demonstraram que o grupo irradiado em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$ , apresentou maior coloração positiva para IP quando comparado com o grupo em meio com  $\text{Ca}^{2+}$  (Figuras 18 e 19).



**Figura 18: Mioblastos irradiados com LBP na presença ou ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , corados com Iodeto de Propídio: (A)** Imagens de Imunofluorescência exibem cultura de mioblastos irradiados com LBP, tratados com meio com ou sem  $\text{Ca}^{2+}$  corados com IP (Barra =  $50 \mu\text{m}$ ). **(B)** (\*) indica diferença significativa entre o grupo sem  $\text{Ca}^{2+}$  e o grupo com  $\text{Ca}^{2+}$ . Foram contados 50 núcleos. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ . Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

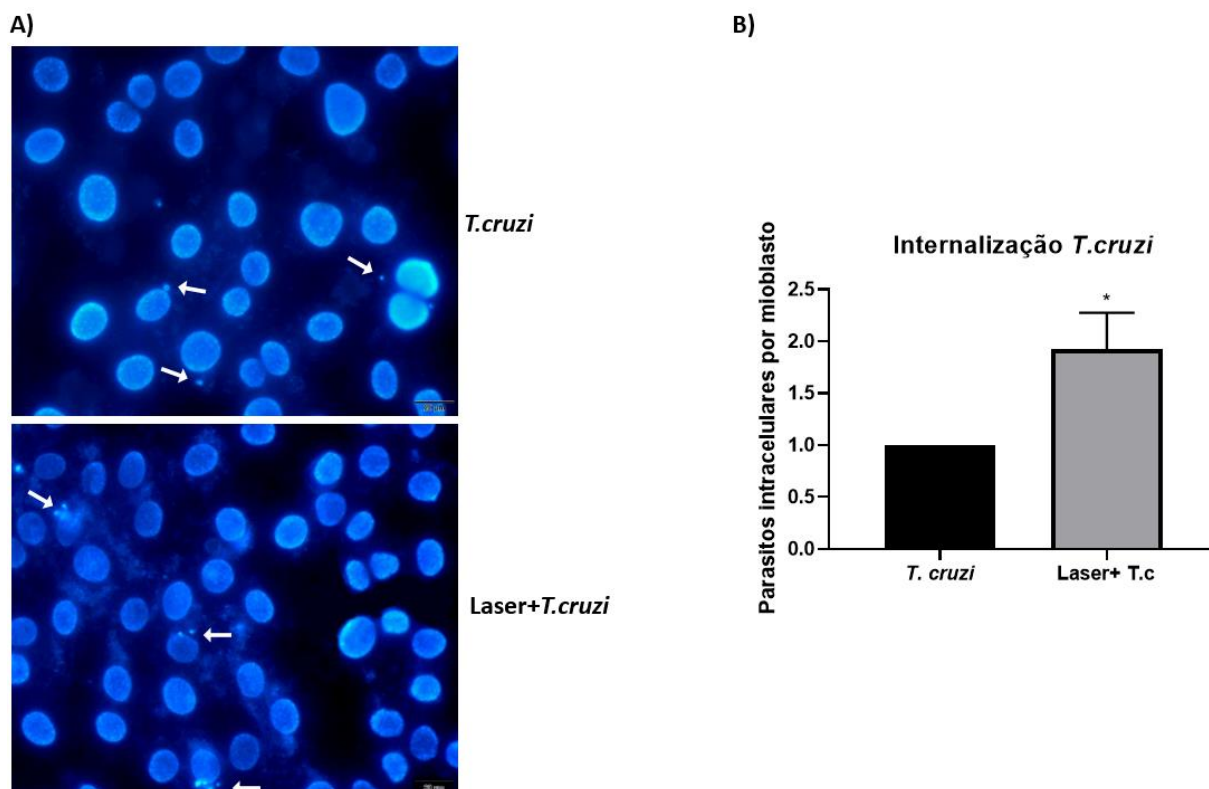


**Figura 19: Miotubos irradiados com LBP na presença ou ausência de Ca<sup>2+</sup>, corados com Iodeto de Propídio:** Imagens de Imunofluorescência exibem cultura de miotubos irradiados com LBP, tratados com meio com ou sem Ca<sup>2+</sup> corados com IP (Barra = 50 μm). (B) (\*) indica diferença significativa entre o grupo sem Ca<sup>2+</sup> e o grupo com Ca<sup>2+</sup>. Foram contados 5 campos aleatórios. As colunas representam a média ± erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para p ≤ 0,05. Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

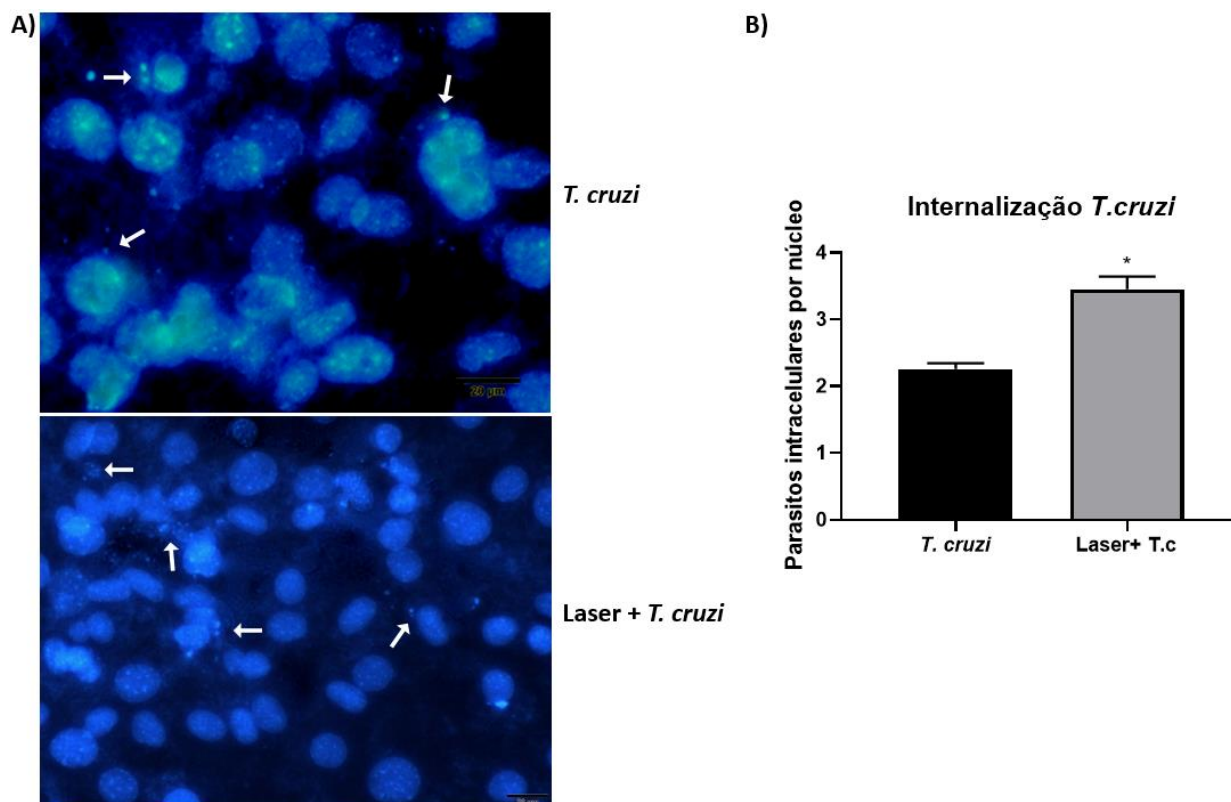
#### 4.4) Quantificação da invasão do *T. cruzi* em células musculares infectadas *in vitro*

Foi avaliado a internalização de *T. cruzi* em sua forma tripomastigota em células musculares infectadas estimuladas previamente com LBP. Após 24 horas de infecção, foi observado um número maior de *T. cruzi* internalizados em mioblastos e miotubos infectados irradiados conforme demonstrado nas figuras 20 e 21.





**Figura 20: A irradiação prévia com LBP modula a invasão do *T. cruzi* em mioblastos.** (A) Imagens exibem um aumento no número de parasitos internalizados (setas) entre o grupo infectado e o grupo infectado irradiado com LBP. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência e a análise da internalização de *T.cruzi* foi feita após coloração com DAPI (Barra = 20  $\mu\text{m}$ ). (B) (\*) indica diferença significativa entre o grupo infectado e o grupo infectado irradiado. Foram contadas 50 células. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ . Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes.



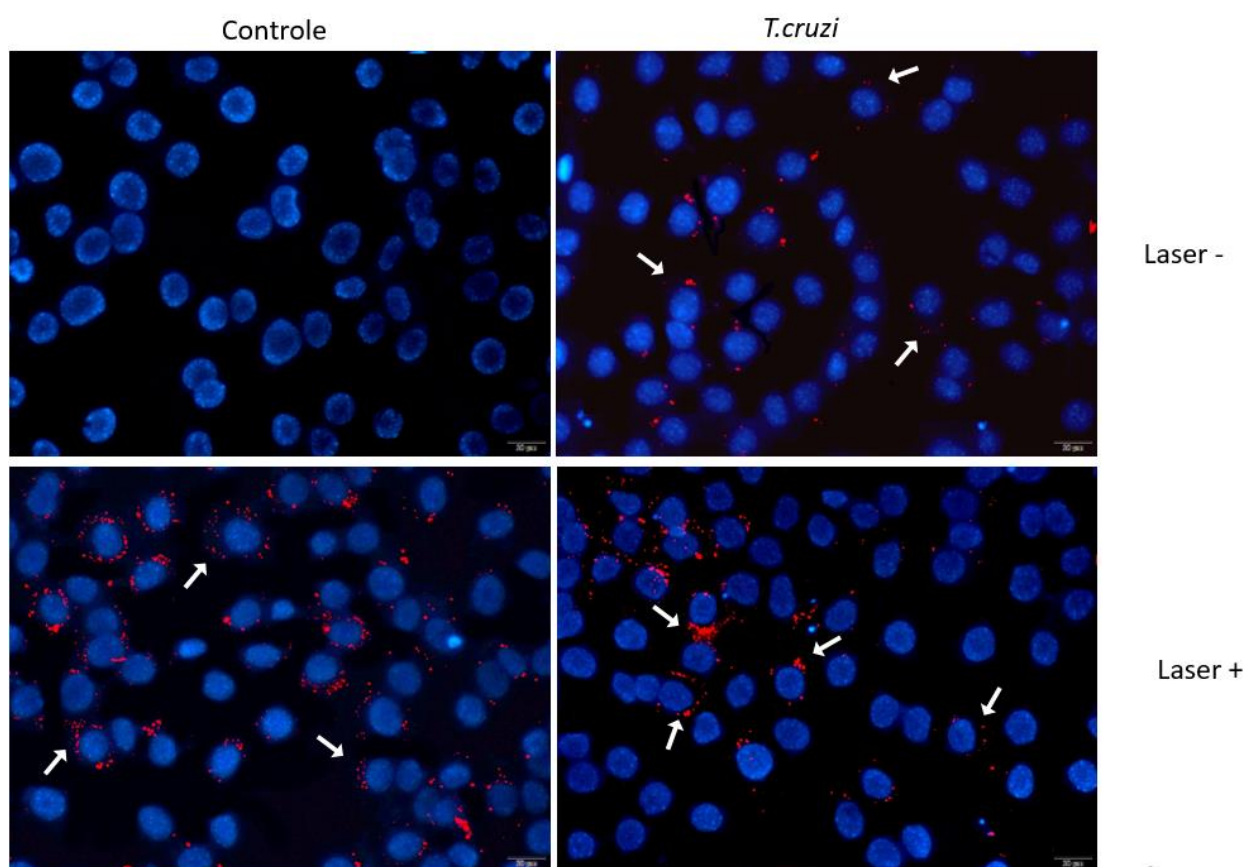
**Figura 21: A irradiação prévia com LBP modula a invasão do *T. cruzi* em miotubos.** (A) Imagens exibem um aumento no número de parasitos internalizados (setas) entre o grupo infectado e o grupo infectado irradiado previamente com LBP. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência e a análise da internalização de *T. cruzi* foi feita após coloração com DAPI (Barra = 20 µm). (B) (\*) indica diferença significativa entre o grupo infectado e o grupo infectado irradiado. Foram contados 55 núcleos. As colunas representam a média ± erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ . Estes resultados são representativos de 1 experimento independente.

#### 4.5) Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em células musculares infectadas *in vitro* com *T. cruzi*, irradiadas ou não com LBP

Com o intuito de avaliar a biogênese de CLs em células musculares previamente irradiadas com o LBP e posteriormente infectadas ou não com *T. cruzi*, (mioblastos MOI 3:1 e miotubos MOI 10:1), análises de imunofluorescência foram realizadas.

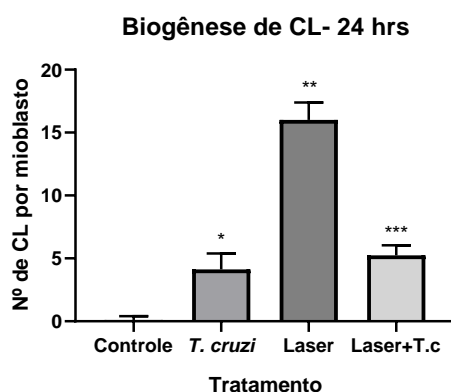
Em mioblastos o aumento no número de CLs foi observado após 24 horas ( $p < 0,05$ ) de infecção com *T. cruzi*, e o mesmo foi observado em miotubos (Figura 22, 23 e 24). Porém de forma interessante, os miotubos que foram previamente irradiados e depois infectados apresentaram uma menor formação de CLs estatisticamente quando comparado com os grupos infectado e controle irradiado (Figura 24 e 25).

De modo interessante, em mioblastos, observa-se que o grupo irradiado com LBP sem infecção, apresentou um aumento significativo na biogênese de CLs quando comparado com os grupos controle, infectado e irradiado infectado (Figuras 22 e 23). Em miotubos também foi observado o aumento no número de CLs após 24 horas ( $p < 0,05$ ) no grupo irradiado com LBP sem infecção quando comparado com os grupos controle e infectado irradiado (Figura 24 e 25).

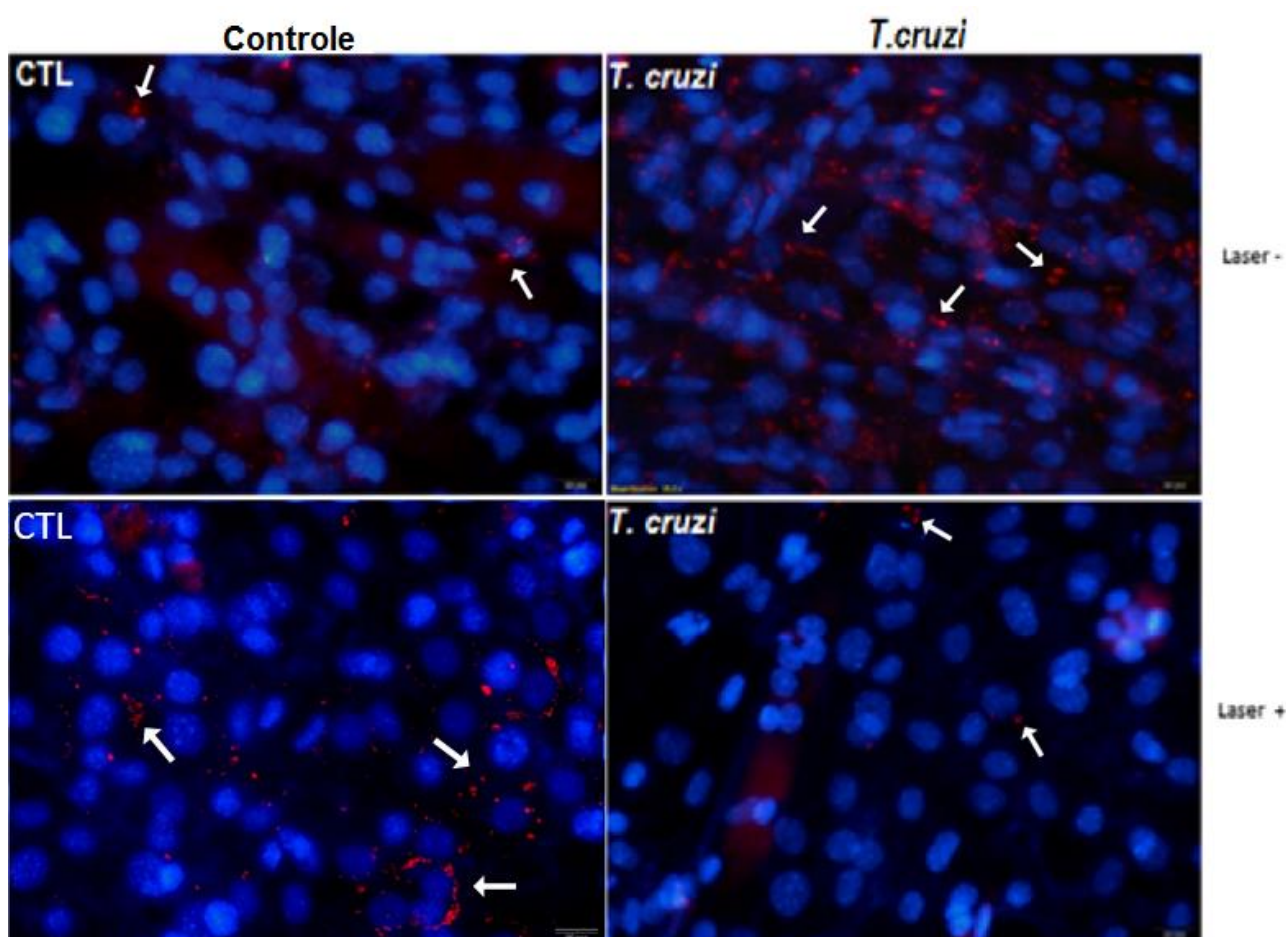


**Figura 22: Imunofluorescência da Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em mioblastos infectados ou não por *T. cruzi* MOI 3:1, irradiados (Laser+) ou não (Laser-) com LBP.** Imagens exibem um aumento na expressão de CLs no grupo infectado (setas), irradiado e infectado irradiado com LBP em relação ao grupo controle no tempo de 24 horas. A biogênese dessas organelas apresentou diferença significativa entre o grupo infectado estimulado com LBP e o grupo infectado não estimulado por célula, mas não quando contado o número de CLs por núcleo por campo. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência e a análise da formação de Corpúsculos Lipídicos foi feita após coloração com Oil Red O, contra-coloração do núcleo com DAPI (Barra = 20  $\mu$ m).

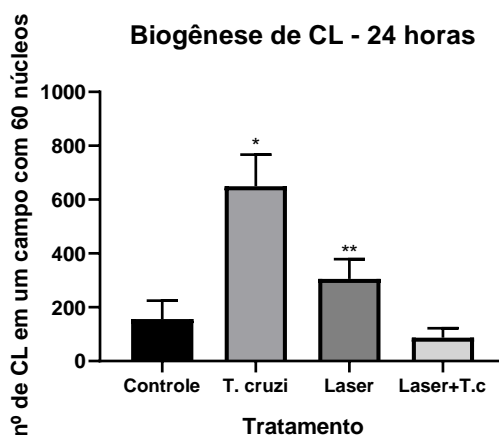




**Figura 23: Biogênese de Corpúsculos Lipídicos, após 24 horas de infecção contados individualmente.** (\*) indica diferença significativa entre o grupo infectado e o grupo controle, o grupo laser irradiado, e laser infectado. (\*\*) indica diferença significativa entre o grupo laser, o grupo controle, e o grupo infectado com laser. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ . Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes.



**Figura 24: Imunofluorescência da Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em miotubos infectados ou não por *T. cruzi* MOI 10:1, irradiados (Laser+) ou não (Laser-) com LBP.** Imagens exibem um aumento na expressão de CLs (setas) no grupo infectado com *T. cruzi* em relação ao grupo controle no tempo de 24 horas. Porém a biogênese dessas organelas diminui no grupo infectado estimulado previamente com LBP em comparação ao grupo controle e infectado não estimulado. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência e a análise da formação de CLs foi feita após coloração com Oil Red O, contra-coloração do núcleo com DAPI (Barra = 20  $\mu$ m).

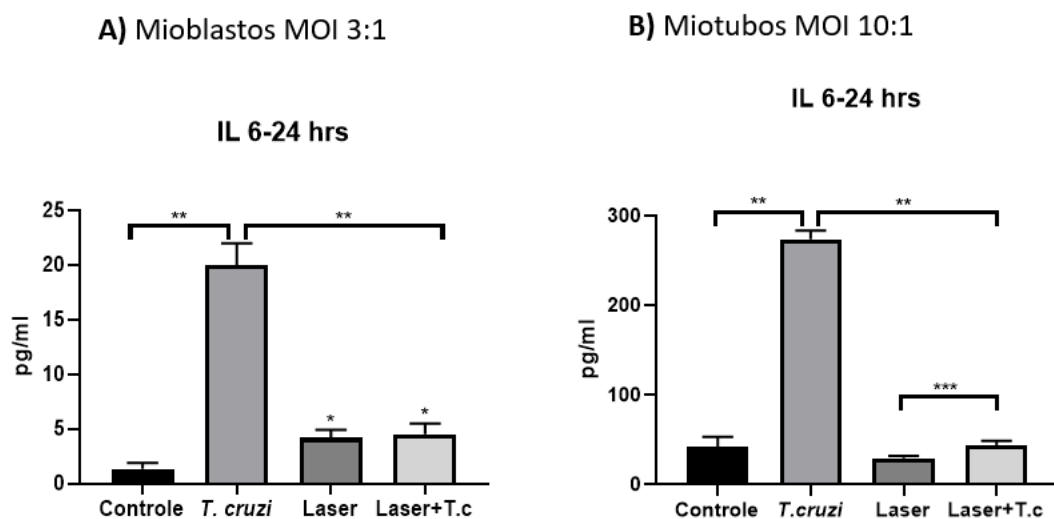


**Figura 25: Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em miotubos, após 24 horas de infecção contados por campo.** (\*) indica diferença significativa entre o grupo infectado e o grupo controle, o grupo laser irradiado, e laser infectado. (\*\*) indica diferença significativa entre o grupo laser, o grupo controle, e o grupo infectado com laser. Foram contados 5 campos com 60 núcleos. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ . Estes resultados são representativos de 1 experimento independente.

#### 4.6) Produção de citocinas em células musculares

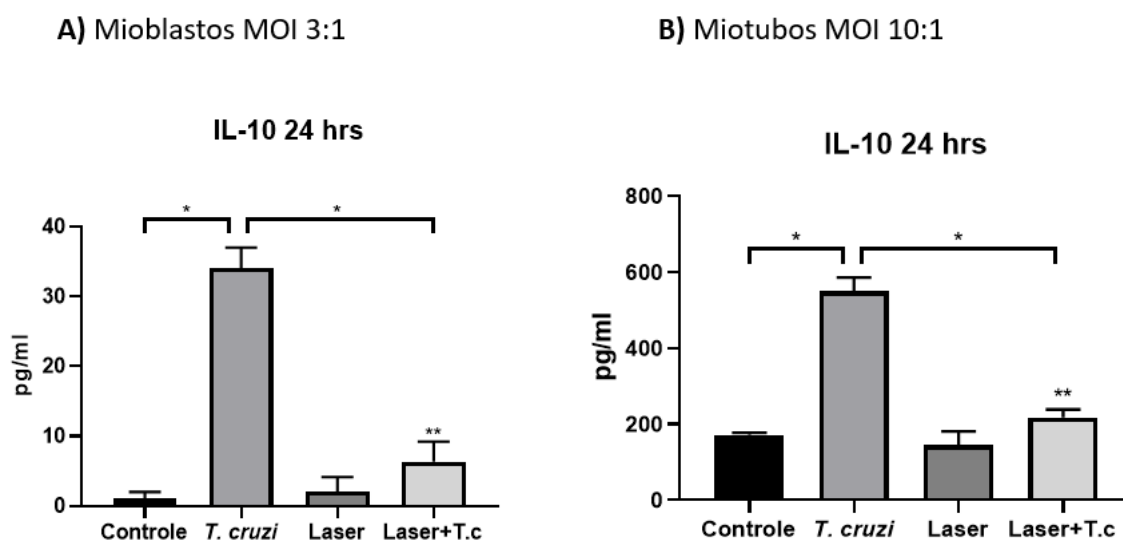
Em mioblastos todos os grupos apresentaram aumento significativo na produção de IL-6 quando comparados com o grupo controle. Por outro lado, em miotubos, o grupo irradiado e irradiado infectado não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, apesar de ter sido observado uma diferença significativa dos níveis de IL-6 entre o grupo irradiado e irradiado infectado (Figura 26).

Mioblastos e miotubos infectados apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos níveis de IL-6 após 24 horas de infecção (Figura 26). De maneira inversa, tanto mioblastos quanto miotubos previamente irradiados com LBP e posteriormente infectados apresentaram níveis menores de IL-6 quando comparados ao grupo infectado não irradiado.



**Figura 26: Síntese de IL-6.** Síntese de IL-6 em (A) mioblastos MOI 3:1 e (B) miotubos MOI 10:1 em grupos controles ou infectados com *T. cruzi*, estimulados ou não com LBP. (\*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. (\*\*) indica diferença significativa entre o grupo infectado e demais grupos; (\*\*\*) indica diferença significativa entre o grupo laser e laser infectado. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

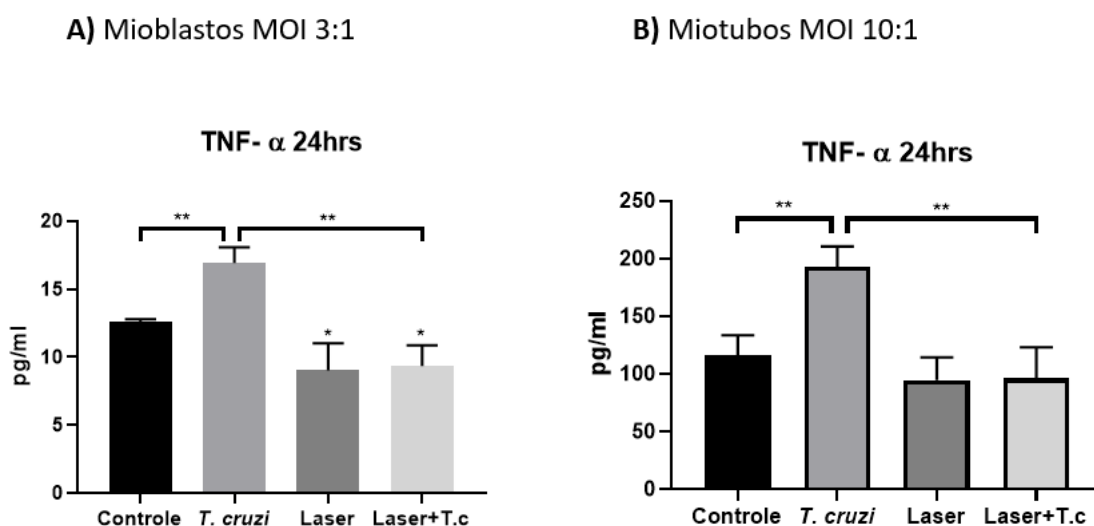
O padrão descrito acima para a IL-6 também pode ser observado para a citocina IL-10, onde mioblastos e miotubos infectados com *T. cruzi* demonstraram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos níveis de IL-10 após 24 horas de infecção quando comparados ao controle, enquanto quando irradiadas e infectadas esses níveis foram significativamente menores (Figura 27).



**Figura 27: Síntese de IL-10.** Síntese de IL-10 em (A) mioblastos MOI 3:1 e (B) miotubos MOI 10:1 em grupos controles ou infectados com *T. cruzi*, estimulados ou não com LBP. (\*) indica diferença significativa entre o grupo infectado e os demais grupos. (\*\*) indica diferença significativa entre o grupo irradiado infectado e os demais grupos. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

Em relação a TNF- $\alpha$  apenas mioblastos irradiados com o LBP apresentaram uma diminuição dessa citocina quando comparados ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 28). Miotubos irradiados não demonstraram diferença significativa nos níveis de TNF- $\alpha$  quando comparados ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ).

Mioblastos e miotubos infectados com *T. cruzi* demonstraram níveis elevados de TNF- $\alpha$  ( $p \leq 0,05$ ) após 24 horas de infecção quando comparado grupo controle. Já os grupos previamente irradiados e infectados com *T. cruzi* ambas as células musculares apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de TNF- $\alpha$  quando comparadas ao grupo infectado.



**Figura 28: Síntese de TNF- $\alpha$ .** Síntese de TNF- $\alpha$  em (A) mioblastos MOI 3:1 e (B) miotubos MOI 10:1 em grupos controles ou infectados com *T. cruzi*, estimulados ou não com LBP. (\*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. (\*\*) indica diferença significativa entre o grupo infectado e os demais grupos. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

A irradiação com o LBP tem se tornado prática comum em variadas áreas da saúde e os benefícios dessa terapia em processos de cicatrização, analgesia, e proliferação, tem sido relatado na literatura desde sua descoberta em 1967 (Cotler *et al*, 2015; Azagdoli B *et al*, 2016; Marquezan M *et al*, 2017). Recentemente novos estudos buscam desvendar como o LBP age em níveis celular e molecular e quais as alterações geradas sobre as estruturas celulares que recebem a irradiação a luz. Descobertas atuais sobre o mecanismo de ação dessa terapia demonstraram que o cromóforo citocromo c oxidase, presente na mitocôndria, exerce o papel de principal receptor da luz irradiada, e através deste, uma sequência de eventos são desencadeados, acarretando em mudanças a nível nuclear da célula (Karu TI, 2008). As alterações desencadeadas pelo LBP geram o aumento do metabolismo, na proliferação e maturação celular e na diminuição de mediadores inflamatórios (revisto em Freitas L *et al*, 2016).

Seguindo a linha dessas recentes pesquisas sobre o LBP, nosso grupo dispôs-se a explorar as consequências da irradiação com o LBP sobre a MP e o seu potencial de alterar a permeabilidade dessa estrutura e acionar o RM, como também analisar os efeitos da fotobiomodulação pelo LBP no metabolismo lipídico celular. Para isso, utilizamos um modelo experimental de células musculares indiferenciadas (mioblastos) e diferenciadas (miotubos).

Primeiramente, foi estabelecido um protocolo de diferenciação celular miogênica, utilizando a linhagem de mioblastos C2C12, um dos modelos de estudo com células musculares mais utilizado (Song KS *et al*, 1996; Corrote *et al*, 2013; Chen R *et al*, 2013; Romanazzo S *et al*, 2015; Dahlmans D *et al*, 2018; Hirai T *et al*, 2018). Os mioblastos, células mononucleadas, são as células precursoras das fibras musculares e se proliferam na presença de fatores de crescimento específicos (principalmente fatores de crescimento de fibroblastos). Na ausência dos fatores de crescimento, dos quais o SFC é carente, os mioblastos deixam de se dividir, alinham-se e fundem-se em miotubos, células musculares multinucleadas que expressam proteínas específicas do músculo, como exemplo a Cav-3 e que irão compor a fibra muscular (revisto em Chal J *et al*, 2017).

Assim, nossos resultados confirmaram o estabelecimento do processo de diferenciação celular a partir da comparação da morfologia celular de mioblastos e miotubos completamente diferenciados (Figuras 12, 13 e 14). As células passaram de morfologia alongada, citoplasma abundante, núcleo grande e fusiforme e vários prolongamentos, para células com um único prolongamento, forma mais alongada em sentido único, e múltiplos núcleos. Além disso as células musculares diferenciadas são caracterizadas pela expressão de Cav-3, específica destas células (Tang Z *et al*, 1996), cujo aumento foi identificado através de análises bioquímicas e imunofluorescência (Figuras 15 e 16), indicando o sucesso no processo de diferenciação dos mioblastos em miotubos.

A partir destes dados, foi avaliado a capacidade destas células de realizarem o RM após serem submetidas a irradiação com o LBP. Diversos modelos de estudo para entender o mecanismo de reparo têm sido propostos com o intuito de esclarecer os agentes envolvidos nesse processo (Miyake K *et al*, 1995; Jimenez *et al*, 2014; Corrote *et al*, 2013). Entre eles, o melhor descrito, é o mecanismo de reparo por endocitose (Tam C *et al*, 2010; Corrote *et al*, 2013).

Esse mecanismo inicia-se com o influxo de cálcio pela lesão, que ativa a migração e a exocitose, liberação do conteúdo lisossomal, e atuação da Esfingomielinase Ácida (ASM) sobre os fosfolípidos da MP, especialmente sobre a esfingomielina, o que resulta na formação de ceramidas, responsáveis pela curvatura e brotamento da MP na região lesionada. Em conjunto com as proteínas caveolinas, passam a compor as cavéolas, que irá se desprender da membrana endocítica e seguir o caminho endossomal, levando consigo a região da MP danificada. (Tam *et al*, 2010, Corrote *et al*, 2013). As cavéolas atuam como sensores de estresse mecânico, participam da homeostase do colesterol, de rotas de transdução de sinal, da migração celular e do controle do ciclo e da polaridade celular (para revisão ver Cheng JPX *et al*, 2016).

Neste estudo, nossos dados demonstraram que independentemente da presença de lesões de membrana, células musculares exibem a presença de cavéolas na superfície da MP (Figura 17), o que corrobora com estudos anteriores, os quais demonstraram a presença de cavéolas em todo o sarcolema de células musculares analisadas em condição de homeostase (Lo HP *et al*, 2015).

Após a diferenciação miogênica, e observado a presença de cavéolas, indispensáveis no mecanismo de RM nas células musculares, o presente trabalho avaliou se o LBP alterava ou não a permeabilidade da MP na presença ou ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ . O influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), é fator primordial de ativação no processo de reparo da MP. A entrada dessa molécula através da alteração da permeabilidade de membrana ou de microlesões formadas na superfície celular é responsável por ativar todas as etapas subsequentes da maquinaria de reparo (Correte et al, 2013; Scheffer LL et al, 2014).

Estudos anteriores já demonstraram que na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  a MP plasmática é incapaz de restaurar sua integridade (Idone V et al, 2008; McNeil et al, 2001; Reddy A et al, 2001; Babiychuk EB et al, 2009; Scheffer LL et al, 2014). Nossos resultados demonstraram, que células musculares irradiadas com LBP, na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , exibiram uma coloração positiva para o iodeto de Propídio (IP), indicando permeabilidade de membrana e assim um possível “dano” a MP (Figura 18 e 19) gerado pela irradiação com o LBP. O IP é comumente utilizado para a marcação de ácidos nucleicos. O influxo intracelular desse corante é um indicativo de permeabilização da MP, e a falha na capacidade de reparo é contabilizada pela coloração do núcleo celular pelo IP (Idone V et al, 2008).

Além disso, os resultados obtidos indicam que as células irradiadas foram reparadas em um processo dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular em concordância com trabalhos anteriores (Idone V et al, 2008; McNeil et al, 2001; Reddy A et al, 2001; Babiychuk EB et al, 2009; Scheffer LL et al, 2014), que demonstraram a importância do influxo de cálcio extracelular para o acionamento da maquinaria de reparo. Correte et al 2013, demonstraram que toxinas formadoras de poros e lesões mecânicas são capazes de induzir o mecanismo de reparo de MP. Nosso grupo, demonstrou pela primeira vez, que a irradiação com LBP também apresenta esse potencial de indução do RM; entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda não foram elucidados.

O reparo de lesões na membrana plasmática de células eucarióticas, é um processo utilizado para invasão celular pelo *T. cruzi*, protozoário este, capaz de infectar diferentes tipos de células, o que facilita sua sobrevivência dentro do hospedeiro mamífero. Fernandes MC et al demonstraram que o *T. cruzi* em sua forma tripomastigota foi capaz de lesionar a MP das células hospedeiras, lesão essa

reparada rapidamente na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (semelhante ao LBP que também desencadeou esse processo  $\text{Ca}^{2+}$  dependente). Também demonstraram que a eficiência da invasão foi significativamente aumentada quando as células foram lesionadas quimicamente (por uma toxina formadora de poro conhecida por estreptolisina O), exibindo um importante papel do sistema de reparo da MP na invasão celular pelo protozoário (Fernandes MC *et al*, 2011).

Neste mesmo trabalho Fernandes *et al* mostraram que a lesão gerada pelo *T. cruzi* na MP foi capaz de ativar a excitose lisossomal, desencadeando a liberação da esfingomielinase ácida (ASM), conseqüente produção e deposição de ceramida, gerando a ativação da via endocítica de reparo, com formação de uma cavéola endocítica enriquecida com ceramida. Os tripomastigotas tiveram sua internalização favorecida nestas condições, onde as propriedades da invaginação recém-formada nos locais de reparo propiciavam uma maior entrada na célula hospedeira (FernandesMC*et al*, 2012).A internalização do *T. cruzi*através da vesícula endocítica formada devido a lesão gerada pelo protozoário, caracteriza o vacúolo parasitóforo, estrutura que abriga momentaneamente o parasito no citoplasma da célula hospedeira (Fernandes MC *et al*, 2011; Fernandes MC *et al*, 2012) (Figura 4).

Dados na literatura demonstraram que o aumento no acionamento da maquinaria de reparo gera um acréscimo no número de *T. cruzi* internalizados, o que favorece a infecção e fortalece a hipótese de que esse parasita tem tropismo por células cardíacas e musculares por serem células em processo de contração constante. Devido a isso, acionam o mecanismo de reparo muito mais frequentemente do que outros tipos celulares(Fernandes MC *et al*, 2011; Fernandes MC *et al*, 2012). Partindo da premissa que o LBP também induz o RM, foi investigado se o LBPfavorece a internalização do parasito ao realizar-se a infecção com o *T.cruzi*.

Os resultados demonstraram que não houve alteração no número de células infectadas entre o grupo irradiado-infectado e o infectado não-irradiado. Porém, em células que foram infectadas, o número de protozoários internalizados aumentou significativamente no grupo que foi irradiado previamente com o LBP (Figura 20 e 21), resultado este que sugere que o LBP ao induzir o acionamento do RM favorece a entrada do parasito na célula.



Além de subverter o mecanismo de RM da célula, tornando este processo um eficiente mecanismo de infecção, o *T. cruzi* estimula outros recursos que contribuem para a sua manutenção no organismo hospedeiro, entre eles a biogênese de CLs (revisto em Almeida PA *et al*, 2018). Sendo sítios especializados de enzimas que biossintetizam mediadores lipídicos, como eicosanoides, a formação de CLs é expressiva em doenças infecciosas, desempenhando diversas funções importantes durante a inflamação (revisto em Melo RCN *et al*, 2011).

Essas organelas apresentam verdadeiros nichos de sobrevivência para diversos patógenos intracelulares, os quais desenvolveram mecanismos para subverter o metabolismo do hospedeiro, sendo capazes de usar os CLs como fonte lipídica para o crescimento e replicação dos parasitos, maturação do vacúolo parasitóforo, e imunossupressão do sistema imune do hospedeiro através da produção de PGE2 (Toledo DAM *et al*, 2016; Vallochi AL *et al*, 2018). Dados da literatura demonstram que diversos patógenos como o *Mycobacterium bovis*, são capazes de induzir a biogênese de CLs em células do hospedeiro (Almeida PE *et al*, 2009, D'Avila *et al*, 2006, Rajaram MVS *et al*, 2014), além de trabalhos existentes demonstrando o aumento dessas organelas em macrófagos infectados por *Mycobacterium leprae* (Mattos KA *et al*, 2010) e por *T. cruzi* (Melo RCN *et al*, 2003, D'Ávilla *et al*, 2011) evidenciando a importância dessa organela em processos celulares e infecciosos.

De acordo com os resultados dos trabalhos citados, nossas análises demonstraram que mioblastos e miotubos infectados *in vitro*, apresentaram uma maior biogênese de CLs quando comparados com células não infectadas, no tempo de incubação de 24 horas (Figura 22, 23, 24 e 25). Além disso, este trabalho buscou investigar se o LBP poderia modular a formação de CLs em células musculares em condições fisiológica, o que poderia também favorecer o processo infeccioso por *T. cruzi*.

Os resultados demonstraram que o LBP foi capaz de aumentar a biogênese de CLs em mioblastos e miotubos irradiados no tempo de 24 horas após a irradiação, quando comparado com o controle. Os resultados obtidos também indicaram que as miotubos irradiados antes da infecção por *T. cruzi* demonstraram uma diminuição na biogênese de CLs, no tempo de 24 horas de incubação, quando comparado com células infectadas, mas não irradiadas. Assim, esses dados sugerem que o LBP

pode estar desempenhando um papel modulador do metabolismo lipídico celular durante a infecção pelo *T. cruzi*, o que pode favorecer a permanência do processo infeccioso.

A interpretação destes achados, porém, não tem sido fácil, uma vez que este trabalho é inédito e não há trabalhos na literatura com dados, nos quais podemos relacionar o efeito modulador do LBP no RM e na biogênese de CLs. Assim, os mecanismos celulares e moleculares fotobiomodulados pelo LBP na MP, na biogênese de CLs e no favorecimento nos processos infecciosos, ainda permanecem para serem elucidados.

Neste estudo, nossos dados demonstraram que o LBP exibiu um potencial modulador na biogênese de CLs, organela com importante papel no curso de infecção por patógenos intracelulares. Além disso, este trabalho procurou explorar os possíveis efeitos do LBP na resposta celular frente a infecção por *T. cruzi*, no que diz respeito à produção de mediadores inflamatórios (citocinas), importantes componentes do sistema imune, responsáveis por regular a resposta imunológica (proliferação, atividade, diferenciação, e produção de células e outras citocinas) (Ferreira VL *et al*, 2018).

Já foi demonstrado que a irradiação com LBP é capaz de alterar os níveis de diversas citocinas pró e anti-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 em experimentos realizados *in vivo* em camundongos (Moreira MC *et al* 2009; Mesquita-Ferrari RA *et al*, 2010; Fukuda T *et al* 2012) e experimentos realizados *in vitro* em amostras de sangue humano e macrófagos (Zhevago NA *et al*, 2006; Gavish L *et al* 2008; Souza N *et al* 2014) em diferentes parâmetros.

Os resultados demonstraram que a irradiação prévia com LBP gerou uma diminuição dos níveis das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  em células musculares infectadas, quando comparadas com o grupo infectado e não irradiado, onde a expressão desses mediadores inflamatórios foi aumentada significativamente (Figura 26, 27 e 28). Além disso, a irradiação com o LBP mostrou ser capaz de alterar os níveis de IL-6 nas células musculares em condição de homeostasia. A produção de TNF- $\alpha$  também foi alterado pela fotobiomodulação em mioblastos não infectados. Corroborando estudos anteriores, esses resultados demonstraram o potencial modulador do LBP sobre os níveis de mediadores inflamatórios (Moreira MC *et*

a/2009; Mesquita-Ferrari RA *et al*, 2010; Fukuda T *et al* 2012; Zhevago NA *et al*, 2006; Gavish L *et al*2008; Souza N *et al* 2014).

Nossos dados mostraram pela primeira vez o potencial modulador do LBP no mecanismo de RM, na biogênese de CLs e na produção de mediadores inflamatórios em células musculares. Efeito esse observado, tanto nas células em condição de homeostasia quanto durante a infecção pelo *T.cruzi*, protozoário que se utiliza desses elementos para garantir uma infecção de sucesso, sugerindo que o LBP em doses elevada tem a capacidade de permeabilizar a MP ativando a maquinaria de reparo, como também apresenta um papel imunomodulador do metabolismo lipídico do hospedeiro. Com isso, estudos mais aprofundados merecem ser feitos a fim de esclarecer, as relações entre o LBP, o RM, e a biogênese de CLs, frente a condições normais ou em condições patológicas diversas, como por exemplo, na Doença de Chagas.

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados avaliamos o papel modulador da Fotobiomodulação na biogênese de Corpúsculos Lipídicos e no reparo de membrana em miotubos durante a infecção por *T. cruzi* *in vitro*, concluímos que:

-A diferenciação de miotubos a partir de células C2C12 é um processo eficiente com pico por volta do 7º dia diferenciação celular e que leva às mudanças na morfologia celular e expressão de Cav-3.

- Confirmando estudos anteriores, mioblastos e miotubos apresentam cavéolas na superfície de sua MP, de maneira basal.

- A Fotobiomodulação possivelmente induz a permeabilidade da MP de mioblastos e miotubos irradiados e consequente ativação do mecanismo de RM.

-Mioblastos e miotubos irradiados com LBP apresentaram um maior reparo de membrana na presença de  $Ca^{2+}$  extracelular.

- A irradiação com o LBP induz uma maior internalização do parasito em células musculares infectadas *in vitro* com *T. cruzi* após 24 horas de infecção.

- No tempo de 24 horas de infecção, há um aumento significativo da biogênese de Corpúsculos Lipídicos em mioblastos e miotubos.

- O LBP tem papel modulador na biogênese de Corpúsculos Lipídicos na ausência ou na presença de infecção por *T. cruzi*.

- O LBP é capaz de alterar os níveis de IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ , na infecção por *T. cruzi* no tempo de 24 hrs de infecção.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, G.R. *et al.* The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1-23, 2018.

ALBAREDA, M. C. *et al.* Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. **International Immunology**, v. 18, n. 3, p. 465–471, 2006.

ALMEIDA, P. E. *et al.* Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Infection Induces TLR2-Dependent Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression and Activation: Functions in Inflammation, Lipid Metabolism, and Pathogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1337–1345, 2009.

ALMEIDA, P. E. DE *et al.* Lipid bodies as sites of prostaglandin E2 synthesis during Chagas disease: Impact in the parasite escape mechanism. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, p. 1–8, 2018.

ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D.-A. *et al.* Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 81, n. 3, p. 154–164, 2016.

ANDRADE, L. O. *et al.* Differential tissue distribution of diverse clones of Trypanosoma cruzi in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 163–172, 1999.

ANDREWS, N. W.; CORROTTE, M. Plasma membrane repair. **Current Biology**, v. 28, n. 8, p. R392–R397, 2018.

ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by Trypanosoma cruzi of a hemolysin active at low pH. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 249–256, 1989.

AZADGOLI, B.; BAKER, R.Y. Laser applications in surgery. **Ann Transl Med**, v. 4, n. 23, p. 452-458, 2016.

BABIYCHUK, E. B. *et al.* Intracellular Ca<sup>2+</sup> operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 8, p.

1126–1134, 2009.

BARTZ, R.; LI, W.-H.; *et al.* Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic . **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 4, p. 837–847, 2007.

BARTZ, R.; ZEHMER, J. K.; *et al.* Dynamic activity of lipid droplets: Protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 8, p. 3256–3265, 2007.

BAYER-SANTOS, E. *et al.* Proteomic analysis of trypanosoma cruzi secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 2, p. 883–897, 2013.

BAYER-SANTOS, E; LIMA, F. M; RUIZ ,J. C; ALMEIDA, I. C; SILVEIRA, J. F. Characterization of the small RNA content of Trypanosoma cruzi extracellular vesicles. *Mol Biochem Parasitol*, v. 192, n. 2, p. 71–74, 2014.

BELLER, G. A.; CONROY, J.; SMITH, T. W. Ischemia induced alterations in myocardial (Na<sup>++</sup>K<sup>+</sup>) ATPase and cardiac glycoside binding. **Journal of Clinical Investigation**, v. 57, n. 2, p. 341–350, 1976.

BERNARDINO DE LA SERRA, J.; SCHÜTZ, G.J.; EGGELING, C.; CEBECAUER, M. There is no simple Model of the Plasma Membrane organization. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, n.105, p. 1-17, 2016.

BI, G. Q.; ALDERTON, J. M.; STEINHARDT, R. A. Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. **Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 6 II, p. 1747–1758, 1995.

BLANCHETTE-MACKIE, E. J. *et al.* Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. **Journal of LIPID RESEARCH**, V. 36, N. 6, P. 1211–1226, 1995.

BLAU, H.M., CHIU, C.P., AND Webster, C. (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. **Cell**, v. 32, 1171-1180.

BOSCARDIN, S. B. *et al.* Chagas' disease: An update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6 B, p. 1373–1384, 2010.

BOZZA, P. T. *et al.* Pathways for eosinophil lipid body induction: Differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 4, p. 563–569, 1998.

BOZZA, P. T.; MELO, R. C. N.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 113, n. 1, p. 30–49, 2007.

BRASAEMLE, D. L. *et al.* Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46835–46842, 2004.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. **Immunological Control of Trypanosoma cruzi Infection and Pathogenesis of Chagas' Disease** *International Archives of Allergy and Immunology*, 1997.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The Mechanisms of Trypanosoma Cruzi Invasion of Mammalian Cells. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 175–200, 1995.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N.W. Signaling and host cell invasion by Trypanosoma cruzi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 461–465, 1998.

BUSCAGLIA, C. A. *et al.* Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229–236, 2006.

CABRINE-SANTOS, M. *et al.* Trypanosoma cruzi: Characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 160–167, 2001.

CALER, E. V. *et al.* Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by Trypanosoma cruzi. **EMBO Journal**, v. 17, n. 17, p. 4975–4986, 1998.

CARDILLO, F., PINHO, R. T., ANTAS, P. R. Z., & MENGEL, J. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 9, p. 1-8, 2015.

CASTRO-GOMES, T. *et al.* Plasma membrane repair is regulated extracellularly by proteases released from lysosomes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–26, 2016.



CHAL, J.; POURQUIÉ, O. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*.

**The Company of Biologists**, v. 144, p. 2104-2122, 2017.

CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of cell science**, v. 115, p. 3049–3059, 2002.

CHEN, R. *et al.* Mechanical-stretch of C2C12 myoblasts inhibits expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and of autoantigens associated with inflammatory myopathies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–9, 2013.

CHENG, J. *et al.* Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 132, n. 3, p. 281–291, 2009.

CHENG, J. P. X.; NICHOLS, B. J. Cavéolae: One Function or Many? **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 3, p. 177–189, 2016.

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y.; CARROL, J. D.; HAMBLIN, M.R. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Ann Biomed Eng**, v. 40, n. 2, p.516-533, 2011.

COOPER, S. T.; MCNEIL, P. L. Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 4, p. 1205–1240, 2015.

COPPENS, I.; VIELEMEYER, O. Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: From storage to potential mediation in parasite metabolic activities. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 6, p. 597–615, 2005.

CORROTTE, M. *et al.* Cavéolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. **eLife**, v. 2013, n. 2, p. 1–30, 2013.

COTLER, H.B.; CHOW, R.T.; HAMBLIN, M.R.; CARROL, J. The use of low level laser therapy (LLLT) for Musculoskeletal pain. **MOJ Orthop Rheumatol**, v. 2, n.5, p. 1-16 ,2015.

CZABANY, T. *et al.* Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 25, p. 17065–17074, 2008.

D'AVILA, H. *et al.* Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Induces TLR2-Mediated Formation of Lipid Bodies: Intracellular Domains for Eicosanoid Synthesis In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3087–3097, 2006.

D'AVILA, H. *et al.* Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 951–961, 2011.

D'AVILA, H.; TOLEDO, D. A. M.; MELO, R. C. N. Lipid bodies: Inflammatory organelles implicated in host-*trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, n. Article ID 478601, p. 11, 2012.

DACKS, J. B.; PEDEN, A. A.; FIELD, M. C. Evolution of specificity in the eukaryotic endomembrane system. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 2, p. 330–340, 2009.

DAHLMANS, D. *et al.* MicroRNA-382 silencing induces a mitonuclear protein imbalance and activates the mitochondrial unfolded protein response in muscle cells. **Journal of Cellular Physiology**, n. August, p. 1–10, 2018.

DEFOR, A. *et al.* Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. 6, p. e1306-11, 2014.

DEMONBREUN, A. R. *et al.* An actin-dependent annexin complex mediates plasma membrane repair in muscle. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 6, p. 705–718, 2016.

DETRAIT, E. *et al.* Axolemmal repair requires proteins that mediate synaptic vesicle fusion. **Journal of Neurobiology**, v. 44, n. 4, p. 382–391, 2000.

DIAS, J. C. P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características biológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 370–375, 2006.

DIGEL, M.; EHEHALT, R.; FÜLLEKRUG, J. Lipid droplets lighting up: Insights from live microscopy. **FEBS Letters**, v. 584, n. 11, p. 2168–2175, 2010.

EL-MAGHRABY, E. M. F.; EL-ROUBY, D. H.; SAAFAN, A. M. Assessment of the effect of low-energy diode laser irradiation on gamma irradiated rats' mandibles.

**Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 7, p. 796–805, 2013.

ESPENSHADE, P. J., & HUGHES, A. L. Regulation of Sterol Synthesis in Eukaryotes. **Annual Review of Genetics**, v. 41 n. 1, p. 401–427, 2007.

FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological effects of low level laser therapy. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 58–62, 2014.

FERNANDES, M. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 5, p. 909–921, 2011.

FERNANDES, M. C *et al.* Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A Unique Strategy That Promotes Persistence. **FEMS Microbiology Rev**, v. 36, n. 3, p. 734–747, 2012.

FERREIRA, V. *et al.* The Classical Activation Pathway of the Human Complement System Is Specifically Inhibited by Calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 3042–3050, 2004.

FLASPOHLER, J.A, RICKOLL, W.L, BEVERLEY, S.M and PARSONS M. Functional identification of a *Leishmania* gene related to the peroxin 2 gene reveals common ancestry of glycosomes and peroxisomes. **Mol Cell Biol**, v. 17(3), p.1093-101, 1997.

FOUST, K. D.; KASPARB. K. NIH Public Access. v. 8, n. 24, p. 4017–4018, 2010.

FREITAS, L.; HAMBLIN, M.R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-level Light Therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**, v. 22, n. 3, p. 1-37.

FRIDOLFSSON, H. N. *et al.* Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. **FASEB Journal**, v. 28, n. 9, p. 3823–3831, 2014.

FUJIMOTO, T. *et al.* Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new “membrane domain” in the cell. **Journal of Cell Biology**, v. 152, n. 5, p. 1079–1085, 2001.

FUJIMOTO, Y. *et al.* Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1644, n. 1, p. 47–59, 2004.

FUKUDA, TY.; TANJI, MM.; SILVA, SR.; SATO, MN.; PLAPLER, H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-

inflammatory cytokines. **Laser Med Sci**, v. 28, p. 1305-1313, 2013.

GAVISH, L., PEREZ, L.S., REISSMAN, P., GERTZ, S.D. Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: implications for the prevention of aneurysm progression. **Lasers Surg Med**, v. 40, n. 8, p. 371-378, 2008.

GODIN, L. M. *et al.* Spatiotemporal dynamics of actin remodeling and endomembrane trafficking in alveolar epithelial type I cell wound healing. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 300, n. 4, p. L615-23, 2011.

GOMES, A. F. *et al.* *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- $\gamma$  and PGE2. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2014.

GOMES, J. A. S. *et al.* Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1185–1193, 2003.

GONÇALVES, C.S. *et al.* Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasites & Vector**, v. 11(83), p.3-14, 2018.

GÕNI, F.M. The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, n.6,p.1467–1476, 2014.

GOZEN, I.; DOMMERSNES, P. Pore dynamics in lipid membranes. **European Physical Journal: Special Topics**, v. 223, n. 9, p. 1813–1829, 2014.

GUO, Y. *et al.* Lipid droplets at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 6, p. 749–752, 2009.

HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy. **Proc. of SPIE**, v. 6140, September, p. 1–25, 2006.

HIRAI, T. *et al.* Baicalein stimulates fibroblast growth factor 21 expression by up-regulating retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$  in C2C12 myotubes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. October 2018, p. 503–510, 2019.

HU, W. P. *et al.* Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 8, p. 2048–2057, 2007.

HUANG, YY.; CHEN, A.C.H; CARROL, J.D.; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low level light therapy. **DoseResponse**, v. 7, n. 4, p. 358-383, 2009.

HUERTAS, R. M. *et al.* Effect and Clinical Implications of the Low-Energy Diode Laser on Bone Cell Proliferation. **Biological Research for Nursing**, v. 16, n. 2, p. 191–196, 2014.

HUSAIN, Z.; ALSTER, T. S. The role of lasers and intense pulsed light technology in dermatology. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v.9, p. 29-40, 2016.

IACOVACHE, I.; GOOT, F. G. VAN DER; PERNOT, L. Pore formation: An ancient yet complex form of attack. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 7–8, p. 1611–1623, 2008.

IDONE, V. *et al.* Repair of injured plasma membrane by rapid Ca<sup>2+</sup> dependent endocytosis. **Journal of Cell Biology**, v. 180, n. 5, p. 905–914, 2008.

JIMENEZ, A. J. *et al.* ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. **Science**, v. 343, p. 986–994, 2014.

KALINSKY, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E<sub>2</sub>. **J Immunol**, v. 188(1), p. 1-18, 2013.

KARU, T. I. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, p. 1091–1099, 2008.

KIM, H. K. *et al.* Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 214–222, 2009.

KUERSCHNER, L.; MOESSINGER, C.; THIELE, C. Imaging of lipid biosynthesis: How a neutral lipid enters lipid droplets. **Traffic**, v. 9, n. 3, p. 338–352, 2008.

KUMAR, Y.; COCCHIARO, J.; VALDIVIA, R. H. The Obligate Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis* Targets Host Lipid Droplets. **Current Biology**, v. 16, n. 16, p. 1646–1651, 2006.

KUSUMI, A., FUJIWARA, T. K., CHADDA, R., XIE, M., TSUNOYAMA, T. A., KALAY,

Z., KASAI, R.S., SUZUKI, K. G. N. Dynamic Organizing Principles of the Plasma Membrane that Regulate Signal Transduction: Commemorating the Fortieth Anniversary of Singer and Nicolson's Fluid-Mosaic Model. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, n. 1, p. 215-250, 2012.

LEY, V. *et al.* The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **The Journal of experimental medicine**, v. 171, n. 2, p. 401–413, 1990.

LIN, F. *et al.* Lasers, stem cells, and COPD. **Journal of Translational Medicine**, v. 8, p. 1–10, 2010.

LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; LUBART, R. A possible mechanism for visible light-induced wound healing. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, n. 7, p. 509–514, 2008.

LIU, H. *et al.* Redox-dependent transcriptional regulation. **Circulation Research**, v. 97, n. 10, p. 967–974, 2005.

LO, H. P. *et al.* The caveolin-Cavin system plays a conserved and critical role in mechanoprotection of skeletal muscle. **Journal of Cell Biology**, v. 210, n. 5, p. 833–849, 2015.

LO, H. P.; HALL, T. E.; PARTON, R. G. Mechanoprotection by skeletal muscle cavéolae. **BioArchitecture**, v. 6, n. 1, p. 22–27, 2016.

LOMBARD, J. Once upon a time the cell membranes:175 years of cell boundary research. **Biology Direct**, v. 9, n. 32, p. 1-35, 2014.

MAHAJAN, S., *et al.* Lipid Droplets: A Dynamic Organelle in Healthy and Disease. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 173–184, 2015.

MAIMAM, T. H. Stimulated Optical Radiation in Rubi. **Nature**, v. 187, n. 4736, p. 493-494, 1960.

MARTINS, A. V, GOMES, A. P, FIETTO, J. L, *et al.* Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. **Infectio.**, v. 16, n. 1, p. 45–48, 2012.

MATTOS, K. A. *et al.* Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis.

**Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 3, p. 371–384, 2010.

MATTOS, K. A. *et al.* Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: A putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 259–273, 2011.

MATTOS, K. A. DE *et al.* Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: Multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. SUPPL.1, p. 156–166, 2012.

MCCULLOUGH, J.; COLF, L. A.; SUNDQUIST, W. I. Membrane Fission Reactions of the Mammalian ESCRT Pathway. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 663–692, 2013.

MCNEIL, P. L. Cellular and molecular adaptations to injurious mechanical stress. **Trends in Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 302–307, 1993.

MCNEIL, P. L. *et al.* Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. **Journal of cell science**, v. 113 ( Pt 1), p. 1891–1902, 2000.

MCNEIL, P. L.; MIYAKE, K.; VOGEL, S. S. The endomembrane requirement for cell surface repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 8, p. 4592–4597, 2003.

MCNEIL, P. L.; STEINHARDT, R. A. Loss, Restoration, and Maintenance of Plasma Membrane Integrity. v. 137, n. 1, p. 21–24, 2000.

MCNEIL, P. L.; TERASAKI, M. Coping with the inevitable: How cells repair a torn surface membrane. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 5, p. 124–129, 2001.

MEER-JANSSEN, Y. P. M. VAN DER *et al.* Lipids in host-pathogen interactions: Pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. **Progress in Lipid Research**, v. 49, n. 1, p. 1–26, 2010.

MELO, R.C.N, FABRINO, D.L, DIAS, F.F and PARREIRA, G.G. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. **Inflammation Research**, v. 55(8), p.342-8, 2006.

MELO, R.C.N, D'AVILA, H, BOZZA, P.T and WELLER, P.F. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. **Methods Mol Biol** v.

689, p.149-61, 2011.

MESTER, E.S.B.; TOTA, J.G. "Effect of laser on hair growth of mice". **Radiolo Orvostud**, v. 19, p. 628-631, 1967.

MIYAKE, K.; MCNEIL, P. L. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. **Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 6 II, p. 1737–1745, 1995.

MÜLLER, A.; MARSCHALL, S.; JENSEN, O. B.; FRICKE, J.; WENZEL, H.; SUMPFF, B.; ANDERSEN, P.E.; Diode laser based light sources for biomedical applications. **Laser Photonics Rev.**, v. 7, n. 5, p. 605-627, 2013.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 5, p. 325–438, 2001.

NÓBREGA, A. A. *et al.* Oral transmission of chagas disease by consumption of A??a?? palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653–655, 2009.

ODORIZZI, G.; BABST, M.; EMR, S. D. Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. **Cell**, v. 95, n. 6, p. 847–858, 1998.

OLOFSSON, SO.; BOSTRÖM, P.; ANDERSSON, L.; RUTBERG, M.; PERMAN, J.; BORÉN J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v, 1791, n. 6, 2009.

OLZMANN, JA.; CARVALHO, P. Dynamics and functions of lipid droplets. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 137-155, 2019.

OVERTVELT, L. VAN *et al.* Trypanosoma cruzi infects human dendritic cells and prevents their maturation: Inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 4033–4040, 1999.

OZEKI, S. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 12, p. 2601–2611, 2005.

PALADE, G.E. Fine structure of blood capillaries. **J Appl Phys** v. 24(1), p.1424, 1953.



PARTON, R.G., MOLERO, J.C., FLOETENMEYER, M., GREEN, K.M., and JAMES, D.E. Characterization of a distinct plasma membrane macrodomain in differentiated adipocytes. **J Biol Chem**, v. 277, p. 46769-46778, 2002.

PATIL, U. A.; DHAMI, L. D. Overview of lasers. **IndianJPlastSurg**, v.41, Suppl, p. 101-113, 2008.

PERVEEN, A.; MOLARDI, C.; FORNAINI, C. Applications of Laser Welding in Dentistry: A State-of-the- Art Review. **Micromachines**, v. 9, n. 5, p. 1-23, 2018.

PIACENZA, L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 7, p. 723–734, 2013.

PINHEIRO, R. O. *et al.* Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 2, p. 181–190, 2009.

PLOEGH, H. L. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 435–438, 2007.

PODBREGAR, M. *et al.* Cytokine response of cultured skeletal muscle cells stimulated with proinflammatory factors depends on differentiation stage. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 8, 2013.

POSTEN, W. *et al.* Low-level laser therapy for wound healing: Mechanism and efficacy. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 3, p. 334–340, 2005.

RAJARAM, M.V.S., BIN, N., DODD, C.E., SCHLESINGER, L.S. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. **Semin Immunol**, v. 26, n. 6, p. 471-485, 2014.

RASSI JR, A., MARIN-NETO, J. . Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 1388, p. 1388–1402, 2010.

REDDY, A.; CALER, E. V.; ANDREWS, N. W. Plasma membrane repair is mediated by Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis of lysosomes. **Cell**, v. 106, n. 2, p. 157–169, 2001.

RENNO, A. C. *et al.* Effect of 830 nm laser phototherapy on osteoblasts grown *in vitro* on Biosilicate scaffolds. **Photomed.Laser Surg.**, v. 28, n. 1557–8550 (Electronic), p. 131–133, 2010.

ROBENEK, H.; ROBENEK, M. J.; TROYER, D. PAT family proteins pervade lipid droplet cores. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 6, p. 1331–1338, 2005.

ROBENEK, M. J. *et al.* Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 7, p. 866–868, 2004.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. *et al.* Liver ultrastructural pathology in mice infected with *Plasmodium berghei*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 30, n. 2, p. 299–307, 1998.

RODRÍGUEZ, A. *et al.* Lysosomes Behave as Ca<sup>2+</sup>. **Cell**, v. 137, n. 1, p. 93–104, 1997.

ROMANAZZO, S. *et al.* IL-12 involvement in myogenic differentiation of C2C12 *in vitro*. **Biomaterials Science**, v. 3, n. 3, p. 469–479, 2015.

ROTHBERG, K. G. *et al.* Caveolin, a Protein Component of Cavéolae Membrane Coats.Pdf. **Cell**, v. 68, p. 673–682, 1992.

SANT'ANNA, E. F.; ARAÚJO, M.T.S.; NOJIMA, L.I.; CUNHA, A.C.; SILVEIRA, B.L.; MARQUEZAN, M. High-intensity laser application in Orthodontics. **Dental Press J. Orthod** v. 22, n. 6, p. 99-109, 2017.

SAFAVI, S. M. *et al.* Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , bFGF, and PDGF in rat's gingiva. **Lasers in Medical Science**, v. 23, n. 3, p. 331–335, 2008.

SAYGUN, I. *et al.* Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. **Lasers in Medical Science**, v. 23, n. 2, p. 211–215, 2008.

SCHEFFER, L. L. *ET AL.* Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. **Nat commun**, v. 5, p. 1–25, 2015.

SCHERER, P. E. *et al.* Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 1, p. 131–135, 1996.

SCHULTZ, R. J. *et al.* Effects of varying intensities of laser energy on articular cartilage: A preliminary study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 5, n. 6, p. 577–588, 1985.

SHEN, C.C, YANG, Y.C, HUANG, T.B, CHAN S.C, and LIU, B.S. Low-Level Laser-Accelerated Peripheral Nerve Regeneration within a Reinforced Nerve Conduit across a Large Gap of the Transected Sciatic Nerve in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

SKINNER, J. R. *et al.* Perilipin 1 moves between the fat droplet and the endoplasmic reticulum. **Adipocyte**, v. 2, n. 2, p. 80–86, 2013.

SRINIVASAN, S., AVADHANI, N. Cytochrome c Oxidase Dysfunction in Oxidative Stress. **Free Radic Biol Med.**, v. 53, n. 6, p. 1252–1263, 2012.

SÖLLNER, T. *et al.* SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. **Nature**, v. 362, n. 6418, p. 318–324, 1993.

SONG, K. S. *et al.* Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 25, p. 15160–15165, 1996.

SOUZA, W. DE. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 89–100, 2009.

SOUZA, NHC.; FERRARI, RAM.; NUNES, FD.; BUSSADORI, SK.; FERNANDES, KPS. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. **Brazil J Phys Ther**, v. 18, n.4, p.308-314, 2014.

TAM, C. *et al.* Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. **Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 6, p. 1027–1038, 2010.

TANG, Z. *et al.* Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 4, p. 2255–2261, 1996.

TARDIEUX, I. *et al.* Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, n. 7, p. 1117–1130, 1992.

TARDIEUX, I.; Nathanson, M. H; H. Andrews, N. W. Role in Host Cell Invasion of

Trypanosoma cruzi-induced Cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> Transients. **J. Exp. Med**, v. 179, n. 4, p. 1017–1022, 1994.

TARLETON, R. L. CD8<sup>+</sup> T Cells in Trypanosoma cruzi Infection. **Semin Immunopathol**, v. 37, n. 3, p. 233–238, 2015.

TAUCHI-SATO, K. *et al.* The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44507–44512, 2002.

TOGO, T. Disruption of the plasma membrane stimulates rearrangement of microtubules and lipid traffic toward the wound site. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 13, p. 2780–2786, 2006.

TOLEDO, D. A. M. *et al.* Lipid body organelles within the parasite trypanosoma cruzi: A role for intracellular arachidonic acid metabolism. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–22, 2016.

TYLER, K.; OLSON, C.; ENGMAN, D. The Life Cycle Of Trypanosoma Cruzi. **American Trypanosomiasis**, v. 7, p. 1–11, 2002.

VAN MEER, G., VOELKER, D.R., FEIGENSON, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 112-124, 2008.

VONTZALIDIS, A., TERZIS, G., MANTA, P. Increased dysferlin expression in Duchenne muscular dystrophy. **Anal Quan Cytopathol Histpathol**, v. 36(1), p. 15-22, 2014.

XIE, X. Y.; BARRETT, J. N. Membrane resealing in cultured rat septal neurons after neurite transection: evidence for enhancement by Ca<sup>2+</sup>-triggered protease activity and cytoskeletal disassembly. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 3257–67, 1991.

WHO, Working to overcome the global impact neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases Health Organization, Geneva, Switzerland, 2010.

YAMAURA, M. *et al.* Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 4, p. 282–290, 2009.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 78, n. 1, p. 1–25, 2006.

ZHANG, L. *et al.* Low-power laser irradiation inhibiting A $\beta$ 25-35-induced PC12 cell apoptosis via PKC activation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 22, n. 1–4, p. 215–222, 2008.

ZHEVAGO, N.A., SAMOILOVA, K.A. Pro- and anti-inflammatory cytokine content *in human* peripheral blood after its transcutaneous (*in vivo*) and direct (*in vitro*) irradiation with polychromatic visible and infrared light. *Photomed Laser Surg*, v. 24, n.2, p. 129-139, 2006.